10482

การผลิตสารแบคเทอริโอซินจาก *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 และ *Lactococcus lactis* รหัส N 190 ในระหว่างการหมักแหนม

(Production of Bacteriocins by *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and *Lactococcus Lactis* N 190 during Nham Fermentation)

T096859

โดย

นางสาวสุธีรพรรณ กองร้อย รหัสประจำตัว 44040163

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาศาสตร์บัณฑิต

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2547

ปร.
ส 7861
2547

สขหมู่.....
เลขทะเบียน...96859
วัน.เดือน.ปี...5 มิ.ย 2549

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การผลิตสารแบคเทอริโอซินจาก *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 และ *Lactococcus lactis* รหัส N 190 ในระหว่างการหมักแหนม

(Production of Bacteriocins by *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and *Lactococcus Lactis* N 190 during Nham Fermentation)

จัดทำโดย

นางสาวสุธีรพรรณ กองร้อย รหัสประจำตัว 44040163

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.... 4 / พ.ย. / 47 ..... **อาจารย์ที่**

ปรึกษาปัญหาพิเศษ (ผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นางสาว สุธีรพรรณ กองร้อย. 2547 : การผลิตสารแบคเทอริโอซินจาก *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 และ *Lactococcus lactis* รหัส N 190 ในระหว่างการหมักแหนม (Production of Bacteriocins by *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and *Lactococcus lactis* N 190 during Nham Fermentation)
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

ในการทดลองนี้ ได้ทำการเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 และ *Lactococcus lactis* รหัส N 190 ลงในระหว่างการหมักแหนม เพื่อตรวจสอบการผลิตกรดของเชื้อแบคทีเรียแลคติก การสร้างสารแบคเทอริโอซิน และความคงทนของแบคเทอริโอซินในระหว่างการหมักแหนม รวมไปถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria innocua* ของแบคเทอริโอซินซึ่งมีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคลิสเตอริโอซิส (listeriosis) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสองตัวในการผลิตแหนมเชิงการค้าต่อไป ผลการทดลองสรุปได้ว่า มีความเป็นไปได้สูงที่จะนำเชื้อแบคทีเรียแลคติก โดยเฉพาะ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 มาใช้ในการผลิตแหนมเชิงการค้าเพราะ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 ซึ่งผลิตสารแบคเทอริโอซิน คือ Pediocin PA-1 จะให้ผลดีกว่า *Lactococcus lactis* รหัส N 190 ซึ่งผลิตสารในกลุ่ม nisin เพราะมีความคงทนไม่สลายตัวในระหว่างการหมัก นอกจากนี้การใช้ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 ยังเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในด้าน รสชาติ ความเปรี้ยว และความชอบโดยรวมมากกว่าแหนมที่หมักตามธรรมชาติโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรีย ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต ช่วยลดต้นทุนการผลิต เพราะสามารถผลิตกรดได้เร็วและมากกว่า ช่วยร่นระยะเวลาในการหมักแหนมทำให้ผลิตแหนมออกจำหน่ายได้เร็วขึ้น และสำคัญที่สุดก็คือ ช่วยให้แหนมมีความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค เพราะแบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในตระกูล Listeria เช่น *Listeria monocytogenes*

สุธีรพรรณ ..... ลายมือนักศึกษา

..... ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

4 พ.ย. 47 ..... วัน / เดือน / ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปัญหาพิเศษ ในหัวข้อเรื่องการผลิตสารแบคเทอริโอซินจาก *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 และ *Lactococcus Lactis* รหัส N 190 ในระหว่างการหมักแหนม สามารถล่วงลุไปได้ด้วยดีจากความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ทางผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าคอยให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา ดูแลเอาใจใส่ รวมทั้งแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบรูณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณอาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา อาจารย์คณะกรรมการปัญหาพิเศษที่ช่วยแนะนำให้คำปรึกษา และสละเวลาอันมีค่า รวมทั้งให้คำแนะนำแก้ไขข้อผิดพลาดในการทดลองให้มีความถูกต้องสมบรูณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาวที่คอยเป็นกำลังใจและสนับสนุนด้านทุนทรัพ์ในการทำปัญหาพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และต้องขอขอบใจเพื่อนๆพี่ๆน้องๆทุกคนที่คอยให้กำลังใจเสมอมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณวารุณี ขัดสีใส คุณจุรารัตน์ ย่างอก และคุณอมรรัตน์ อัคนิจ ที่คอยช่วยเหลือในทั้งในด้านการทำงานและการทำรูปเล่ม ถ้าไม่มีบุคคลเหล่านี้การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้คงไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอบคุณมากค่ะ

ผู้จัดทำ

22 ตุลาคม 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์	3
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	4
2.1 แหนม	4
2.2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแหนม	4
2.3 กล้าเชื้อจุลินทรีย์	6
2.4 เชื้อแบคทีเรียแลคติก	8
2.5 การหมักของแบคทีเรียแลคติก	10
2.6 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียแลคติก	12
2.7 เชื้อแบคทีเรียในGenus Listeria	17
2.8 ปัญหาของผลิตภัณฑ์แหนม	18
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	20
3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี	20
3.2 ขั้นตอน และวิธีการทดลอง	22
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	28
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก ก	37
ภาคผนวก ข	38
ภาคผนวก ค	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ค่าพีเอชเฉลี่ยในตัวอย่างแหนมที่วัดได้ในระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงต่างๆ	28
2. ปริมาณของ NaOH ที่ไทเทรตได้ และค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่คำนวณได้จากตัวอย่างแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ	29
3. ปริมาณของ NaOH ที่ไทเทรตได้ และค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่คำนวณได้จากตัวอย่างแหนมที่เติมกล้า เชื้อ *Pediococcus pentosaceu* รหัส TISTR 536	30
4. ผลการตรวจสอบการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536	31
5. ผลทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ขั้นตอนกระบวนการหมักแบบ Homofermentative ของ LAB	13
2.	ขั้นตอนกระบวนการหมักแบบ Heterofermentative ของ LAB	14
3.	ขั้นตอนในการทำการทดลองทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของแบคเทอริโอซิน	26
4.	กราฟเปรียบเทียบแนวโน้มการลดลงของค่าพีเอชในตัวอย่างแหนม ในระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงต่างๆ	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

อาหารหมักพื้นเมืองของไทยมีมากมายหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ส้มฟัก ปลาร้า ข้าวหมาก ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง เป็นต้น ซึ่งในการทดลองนี้ได้นำแหนมมาเป็นตัวอย่างในการทดลอง

การผลิตแหนมในอดีตนั้นมีสูตรที่ไม่แน่นอนแล้วแต่ความต้องการของผู้บริโภค การหมักแหนมขึ้นอยู่กับเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบตามธรรมชาติ และสามารถสร้างกรดได้ ดังนั้นจึงก่อให้เกิดปัญหาตามมาคือ คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่สม่ำเสมอ ผู้ประกอบการมีความเสี่ยงกับการผลิตที่อาจจะได้ผลิตภัณฑ์ไม่ตรงตามความต้องการค่อนข้างสูง อายุการเก็บรักษาค่อนข้างสั้น และที่สำคัญคือ เกิดความไม่ปลอดภัยของผู้บริโภคต่อการรับประทานแหนม ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการหมักแหนมตามธรรมชาติอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้น อย่างสมบรูณ์ ซึ่งอาจมีผลทำให้เชื้อโรคสามารถเจริญเติบโตได้และสร้างสารพิษก่อนที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกจะเจริญขึ้น อีกทั้งส่วนใหญ่การบริโภคแหนมจะบริโภคในรูปแหนมดิบที่ไม่ผ่านความร้อนในการฆ่าเชื้อ จึงนับว่าปัจจุบันผู้บริโภคมีความเสี่ยงสูงในการบริโภคแหนม ดังนั้นการใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่โดยการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในการผลิตแหนม นับได้ว่าเป็นทิศทางใหม่ที่มีแนวโน้มประสบผลสำเร็จสำหรับอุตสาหกรรมดังกล่าว ทั้งในแง่ทำให้คุณภาพแหนมมีความสม่ำเสมอ เพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการหมัก และยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Swetwiwathana and Lotong, 1999)

การหมักแหนมส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียในตระกูล *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc* เป็นต้น โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะไปเปลี่ยนน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตในอาหารให้เป็นกรดแลคติก อาหารจึงมีรสเปรี้ยวและความเป็นกรดเป็นด่าง(pH)ของอาหารก็ลดลง จึงมีผลช่วยในการถนอมอาหารได้ ไม่ใช่เพียงเพราะกรดแลคติกที่ทำให้ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารลดลงเท่านั้น แต่มีสารอีกหลายๆชนิดที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักก็มีส่วนช่วยในการถนอมอาหารด้วย สารเหล่านี้ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล คาร์บอนไดออกไซด์ แบคเทอริโอซิน และสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆที่ยังไม่ระบุว่าเป็นสารประเภทใด (Un-identified antagonistic substance) เป็นต้น (วิเชียร, 2534) จากคุณสมบัติต่างๆของสารที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นนี้ ล้วนมีบทบาทในการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บอาหารได้เป็นเวลานานๆ โดยสารที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยมากที่สุด คือ แบคเทอริโอซินและสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆที่ยังไม่ระบุว่าเป็นสารประเภทใด เพราะมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง รวมทั้งยังเป็นผลผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาวิจัยแล้วว่าไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย และเป็นเชื้อชนิดเดียวที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น GRAS (General Recognized

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

as Safe) สามารถใช้เติมในอาหารได้ โดยอาจเติมในรูปของสารบริสุทธิ์ หรือในรูปของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ จึงมีการริเริ่มใช้สารเหล่านี้เพื่อประโยชน์ในด้านการถนอมอาหารในอุตสาหกรรมการหมักต่างๆ ซึ่งมีจำนวนมาก และก้าวหน้าสูงในปัจจุบัน แต่มักมีปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียและทำให้เกิดโรคเสมอ การศึกษาเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งดังกล่าวน่าจะเป็นหนทางที่ดีในการหาสารที่ใช้ทดแทนสารกันบูดประเภทสารเคมี เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก ไนเตรต ไนไตรต์ เป็นต้น ซึ่งถ้าสะสมอยู่ในร่างกายของผู้บริโภคเป็นเวลานานจะทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ผลการยับยั้งนี้จะเกิดขึ้นกับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคด้วย เช่น เชื้อในตระกูลลิสทีเรีย นอกจากอาหารนั้นจะปลอดภัยแล้วแบคทีเรียแลคติกที่ยังมีชีวิตเหลืออยู่ในอาหารยังทำให้เกิดสมดุลของลำไส้ และมีผลในการป้องกันโรคท้องร่วงจากเชื้อโรคหลายชนิด ซึ่งเรียกแบคทีเรียที่ใช้เพื่อประโยชน์ดังกล่าวว่า “โปรไบโอติก” (probiotic)

จากประโยชน์ที่ได้จากแบคทีเรียแลคติก ดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น การทดลองนี้จึงมุ่งเน้นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมที่มีคุณภาพที่ดีสม่ำเสมอ ปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคต่างๆโดยใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่พิสูจน์แล้วว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน เพื่อมาตรฐานชีวิตของผู้บริโภคส่วนรวม ซึ่งในการศึกษานี้จะศึกษาถึงการสร้างแบคเทอริโอซินของสายพันธุ์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในระหว่างการหมักแหนม รวมถึงความคงทนของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตขึ้นในระหว่างการเก็บผลิตภัณฑ์หลังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536และ *Lactococcus lactis* รหัส N 190 ที่มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงและเปรียบเทียบผลที่ได้กับแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก
2. ศึกษาความผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 และ *Lactococcus lactis* รหัส N 190 ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินโดยตรวจสอบการสร้างและความคงทนของแบคเทอริโอซินระหว่างการหมักแหนม รวมถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ในแหนมและทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก
3. ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้กล้าเชื้อแลคติกในการหมักแหนมเชิงการค้าต่อไป โดยทำการประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของแหนมทั้ง 3 แบบ ด้วยวิธี Hedonic scale

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1. แหนม

แหนมหรือที่เรียกกันสากลว่า Fermented pork sausage เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านในประเทศไทยประเภทหนึ่งที่นิยมบริโภคกันทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้จากการหมักเนื้อหมู โดยทำจากเนื้อหมูบดและหนังหมูเป็นหลักทำการผสมกับส่วนประกอบต่างๆ เช่น เกลือแกง ข้าวสุก กระเทียม และเครื่องปรุงอื่นๆ บรรจุลงในถุงพลาสติกหลายรูปแแบบหรือบรรจุในถุงพลาสติกแบบธรรมดา และหุ้มด้วยใบตอง นิยมนำมาบริโภคโดยไม่ต้องผ่านการทำให้สุก (อรนุช, 2530)

2.2. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแหนม

2.2.1. การผลิตผลิตภัณฑ์แหนม

การผลิตแหนมนั้น จะใช้เนื้อหมู หนังหมู ข้าวเจ้า หรือข้าวเหนียวหุงสุก กระเทียม และโซเดียมไนเตรทหรือโซเดียมไนไตรท์ เนื้อหมูไม่ต้องล้างน้ำเนื่องจากเนื้อจะดูดซึมน้ำทำให้มีความชื้นสูง และอาจเน่าเสียได้ง่ายระหว่างการหมัก นำเนื้อมาหั่นและบดให้ละเอียด ผสมเครื่องปรุง คือ เกลือโซเดียมไนเตรทหรือโซเดียมไนไตรท์ กระเทียมและข้าวเหนียว นวดจนกระทั่งเนื้อเหนียวเป็นก้อนไม่ติดมือ เติมหนังหมูและนวดต่อให้เข้ากัน ใส่พริกขี้หนูเพื่อให้มีรสเผ็ด จากนั้นห่อด้วยใบตองหรือถุงพลาสติก มัดให้แน่นเพื่อไล่อากาศภายใน การหมักในช่วง 1-2 วันแรก พบ *Pediococcus cerevisiae* *L. plantarum* ส่วนในช่วงหลังของการหมักจะพบ *L. bravis* เจริญต่อจากแบคทีเรียกลุ่มแรก แหนมที่หมักได้จะมีพีเอชประมาณ 4.45-4.55 และพบว่ามีไวตามินบี 1 และ บี 2 อยู่สูง แขวนหมักไว้ 2-3 วันก็รับประทานได้ (พรพรรณ, 2544)

2.2.2. วัตถุเจือปนที่ใช้เติมลงในการผลิตแหนม

ในการผลิตแหนมผู้ประกอบการจะมีการเติมสารประกอบประเภทไนเตรท ไนไตรท์ และเกลือของกรดแอสคอร์เบทในการผลิต ซึ่งเมื่อนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์แล้วความเป็นกรดของแหนมจะทำให้สารประกอบดังกล่าวสลายตัวไป ดังนั้นจึงควรบริโภคแหนมเมื่อเปรี้ยวเท่านั้น

2.2.2.1. เกลือไนเตรทและไนไตรท์ (nitrate and nitrite)

เกลือไนเตรทและไนไตรท์ นิยมใช้กันในรูปของเกลือโซเดียมหรือโซเดียม การเติม เกลือไนเตรทและไนไตรท์ลงในผลิตภัณฑ์แหนมมีวัตถุประสงค์ดังนี้

ก. ทำให้เกิดสีแดงและรักษาสีแดงในผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. ช่วยเพิ่มรสชาติ และกลิ่นรสให้แก่ผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นกลิ่นรสเฉพาะตัวในผลิตภัณฑ์แหนม

ค. ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และป้องกันการงอกของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ โดยเฉพาะพวก *Clostridium botulinum*

ง. ช่วยยับยั้งการหืนของไขมันในผลิตภัณฑ์ โดยไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเดชั่นของไขมัน

การใช้สารประเภทนี้จำเป็นต้องใช้ในปริมาณจำกัด เพื่อให้เหลือตกค้างในผลิตภัณฑ์น้อยที่สุด และไม่ก่อให้เกิดสารไนโตรซามีนที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค เกลือไนไตรท์และไนเตรทที่ใช้ในทางการค้าจะผสมกันออกมาเพื่อสะดวกในการใช้ มีชื่อทางการค้าว่าผงเพรค (praque powder)

ปัจจุบันให้ใช้ไนไตรท์ได้เพียงอย่างเดียวในการหมักเนื้อ และให้ใช้ได้ในปริมาณสูงสุดเพียง 156 ppm (ในรูปของเกลือไนไตรท์) แต่ในทางปฏิบัติจะใช้เพียง 120 ppm หรือน้อยกว่านี้ แต่จะใช้ร่วมกับสารรีดิวส์ตัวอื่น เช่น โซเดียมแอสคอร์เบท 500-550 ppm

2.2.2.2. เกลือของกรดแอสคอร์เบท (ascorbate)

เกลือของกรดแอสคอร์เบท นิยมใช้ในรูปของเกลือโซเดียม สารตัวนี้มีคุณสมบัติเป็นสารรีดิวส์ (reducing agent) ที่เติมลงในผลิตภัณฑ์แหนมเพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ ดังนี้ คือ

ก. ช่วยเร่งการเกิดสี และทำให้สีคงตัว โดยจะเร่งปฏิกิริยาการเกิดไนตริกออกไซด์ให้เร็วขึ้น จึงช่วยเร่งอัตราการหมัก และลดปริมาณการตกค้างของไนไตรท์ให้น้อยลง

ข. ช่วยลดการเกิดสารไนโตรซามีนซึ่งอาจทำให้เกิดโรคมะเร็ง

ค. ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Clostridium botulinum*

ง. มีสมบัติเป็นสารกันหืน ช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสคงตัว

การใช้สารประเภทนี้ในผลิตภัณฑ์ อนุญาตให้ใช้เติมใส่ในส่วนผสมของเนื้อได้ไม่เกิน 8.75 กรัมต่อกิโลกรัมของเนื้อสัตว์

2.2.3. คุณลักษณะที่ดีของแหนม

คุณลักษณะที่ดีของแหนมต้องมีเนื้อแน่น คงรูป ส่วนประกอบต่างๆต้องผสมรวมกันอยู่อย่างทั่งถึง มีสีชมพูแดงตามธรรมชาติของแหนมที่พร้อมจะบริโภค อาจสังเกตจากสีของพริกหรือสีของแหนม ถ้าแหนมที่ผลิตเสร็จใหม่จะมีสีแดงเหมือนหมูสด ซึ่งลักษณะดังกล่าวแสดงว่าแหนมยังไม่เกิดการหมักและยังจะไม่มีรสเปรี้ยว ถ้าสีของหมูเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนและพริกมีสีซีดลงนั้นแสดงว่าแหนมเกิดการหมักและมีรสเปรี้ยวแล้ว แต่ถ้าแหนมมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือเริ่มเขียวแสดงว่าแหนมเริ่มหมดอายุแล้ว กลิ่นรสที่ดีของแหนมต้องเปรี้ยว ปราศจากกลิ่นแปลกปลอม เช่น กลิ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหม็นอับ กลิ่นสาบของเนื้อหมู กลิ่นเพศ(sex odor) และต้องปราศจากสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ เช่น ผม ขน กระดูก ยกเว้นขนที่อยู่ในหนังหมูและกระดูกอ่อนของใบหู แหนมควรมีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 22 และไขมันไม่เกินร้อยละ 8

2.2.4. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

อาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ได้แก่ แหนม กะปี ปลาร้า ปลาจ่อม ส้มฟัก บูดู เป็นต้น (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2536)

ยีสต์ต่อกรัม	น้อยกว่า 1×10^4
ราต่อกรัม	น้อยกว่า 500
MPN *E. coli*	น้อยกว่า 10
S. cereus ต่อกรัม	น้อยกว่า 100
C. perfringens ต่อ 0.01 กรัม	ไม่พบ
Salmonellae ต่อ 25 กรัม	ไม่พบ
พยาธิ	ไม่พบ

2.3. กล้าเชื้อจุลินทรีย์

2.3.1. การใช้กล้าในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

การใช้กล้าเชื้อเพื่อแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้น เริ่มภายหลังจากที่ได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อใช้กับผลิตภัณฑ์นมหมักอย่างได้ผลดีแล้ว โดยเริ่มใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus cerevisiae* หมักไส้กรอกเป็นครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาในปี 1955 กล้าที่ใช้เป็นไลโอฟิลไลส์มีชื่อทางการค้าว่า ACCEL และในปี 1958 American Meat Institute Foundation ของสหรัฐอเมริกาได้ยอมรับการใช้กล้าดังกล่าว จึงมีการใช้กล้าชนิดนี้ในโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์กันอย่างแพร่หลายในยุโรปและอเมริกา และเนื่องจากไนเตรทเป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งในการแปรรูปเนื้อสัตว์ ซึ่งเมื่อถูกรีดิวส์ไปเป็นไนไตรท์ และไนตรัสออกไซด์ ตามลำดับแล้ว ไนตรัสออกไซด์จะมีผลในการตรึงสีเนื้อสัตว์ คือ เปลี่ยนจากไมโอโกลบินซึ่งมีสีแดงอมม่วง ไปเป็นไนตริกออกไซด์ไมโอโกลบินซึ่งมีสีแดง การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์นั้นเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์

ที่มีการเลือกใช้ *Pediococcus cerevisiae* ในระยะเริ่มแรกแทนที่จะใช้ *Lactobacillus* spp. เนื่องจาก เมื่อผลิตเป็นกล้าไลโอฟิลไลส์ *Pediococcu* spp. มีชีวิตอยู่รอดนานกว่า ต่อมามีการค้นพบวิธีการเติมสารต่างๆ เพื่อป้องกันการตายและการบาดเจ็บของเชื้อในขณะการผลิตกล้า จึงได้มีการใช้เชื้ออื่นๆ รวมทั้ง *Lactobacillus* spp. ส่วนใหญ่จะใช้เฉพาะกลุ่มที่เป็น Homofermentative เช่น *L. plantarum* สำหรับกลุ่ม Heterofermentative เช่น *L. brevis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทบทวนการจำแนกชนิแบคทีเรียสกุล *Pediococcus* ในปี 1976 ได้ยกเลิกชื่อ *Pediococcus cerevisiae* และแบ่งชื่อที่อยู่ในอยู่ในสปีชีส์นี้ออกเป็นสองสปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* และ *Pediococcus acidilactici* (นภา, 2534)

2.3.2. ประโยชน์ของการใช้กล้าเชื้อ

การใช้กล้าเชื้อในการแปรรูปผลิตภัณฑ์มีผลดีหลายประการด้วยกัน ได้แก่

2.3.2.1. ลดระยะเวลาการหมัก

2.3.2.2. สามารถควบคุมการหมัก และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น

2.3.2.3. ลดการสะสมของไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง เพราะการเติมกล้าเชื้อทำให้ผลิตกรดเป็นไปอย่างรวดเร็ว มีผลให้ไนไตรท์ที่เกิดจากการรีดิวส์ไนเตรทสลายตัวไปเป็นไนตรัสออกไซด์ จึงทำให้ปริมาณสะสมของไนไตรท์ลดลง การเกิดไนโตรซามีนจึงลดลงด้วย

2.3.2.4. กล้าเชื้อ *Pediococcus* spp. และ *Micrococcus* spp. ผลิตเอนไซม์ซูโดแคตาแลส (pseudocatalase) สามารถเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำและออกซิเจน เป็นการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้หมดไป ซึ่งสารนี้มีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์ซีด ไม่น่ารับประทาน

2.3.2.5. ลดระดับฮีสตามีนในอาหารหมัก การหมักโดยใช้เชื้อจากธรรมชาติ ซึ่งมีจุลินทรีย์ปนกันอยู่หลายชนิด จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ฮีสทิดีนคาร์บอกซิเลส จะเปลี่ยนฮีสทิดีนเป็นฮีสตามีน การเติมกล้าเชื้อทำให้การหมักเกิดเร็วขึ้น จึงเป็นการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์เหล่านี้

2.3.3.6. ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค ซึ่งในปัจจุบันเป็นวัตถุประสงค์หลักของการใช้กล้าเชื้อในการแปรรูปผลิตภัณฑ์

2.3.3. แหล่งสายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักนั้น นอกจากผู้ผลิตจะทำการคัดเลือกเองแล้ว ยังขอบริการได้จากแหล่งเก็บพันธุ์จุลินทรีย์ (Culture Collection) ทั้งในและนอกประเทศ ซึ่งหน่วยงานเหล่านี้ส่วนใหญ่จะมีสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้แล้วว่ามีคุณสมบัติดีพอสมควร และเก็บรักษาเชื้อไว้ในรูปเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธีการที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด สำหรับประเทศไทยนั้น มีศูนย์การเก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์แห่งภาคพื้นเอเชียอาคเนย์ (Microbiological Resources center) หรือที่เรียกย่อๆว่า MIRCEN อยู่ที่ศูนย์สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีแหล่งเก็บสายพันธุ์จุลินทรีย์อยู่หลายแห่ง เช่น American Type Culture Collection (ATCC) และ Northern Regional Research Center (NRRL) เป็นต้น

2.4. เชื้อแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB)

เชื้อแบคทีเรียแลคติกจัดอยู่ใน Family Lactobacillaceae มีลักษณะที่เป็นท่อนยาว ท่อนสั้น หรือท่อนกลม แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophillic) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) เป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน (Frazier และ Dunn, 1979) ไม่มี cytocrome และ porphyrin ซึ่งเป็นผลเมื่อทดสอบ catalase และ oxidase ให้ผลเป็นลบ แบคทีเรียแลคติกบางพวกใช้ออกซิเจนได้โดยการใช้เอนไซม์ fravoprotien oxidase ซึ่งจะได้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือออกซิไดซ์ NADH ที่ได้จากกระบวนการ dehydrogenation ของน้ำตาล (บุญเทียม, 2546) โดยทั่วไปจะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สามารถสร้างสปอร์ และไม่ส่งผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์คะตะเลส คุณลักษณะที่สำคัญอย่างหนึ่งของแบคทีเรีย คือ ทนกรด และไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีเท่าๆกับสภาวะไร้อากาศ และทนต่อออกซิเจน แต่เดิมจัดกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกไว้เพียง 4 สกุล ได้แก่ Pediococcus, Leuconostoc, Streptococcus และ Lactobacillus (Frazier และ Westhoff, 1988) ซึ่งปัจจุบันเพิ่มสกุลของแบคทีเรียแลคติกรวมแล้ว 8 สกุล ได้แก่ Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus และ Vagococcus โดยที่ Camobacterium จัดเป็นสมาชิกในกลุ่ม Lactobacilli ส่วนสามสกุลหลังที่ได้เพิ่มนั้นเดิมเป็นสมาชิกในกลุ่ม Streptococcus

2.4.1. Pediococci

จัดเป็น Homofermentative มีรูปร่างค่อนข้างกลม จัดเรียงตัวแบบกลุ่ม กลุ่มละ 4 (Tetrads) แบ่งเป็น 2 ระนาบ บางครั้งอาจพบเซลล์เดี่ยว เซลล์เรียงกันเป็นคู่ๆ หรือเป็นสายสั้นๆ จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศปริมาณเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (Micro aerophillic bacteria) สามารถเจริญที่อุณหภูมิประมาณ 7-45 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-32 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังเจริญได้ในน้ำเกลือซึ่งเข้มข้นไม่เกิน 5.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถเจริญได้ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 6-10 เปอร์เซ็นต์

Pediococcus มักพบในอาหารประเภทผักผลไม้ หรือในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกเปรี้ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2. Streptococci

จัดเป็น Homofermentative รูปร่างกลมจัดเรียงเป็นคู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสายเจริญได้ทั้งสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) Streptococcus บางชนิดก่อให้เกิดโทษกับมนุษย์และสัตว์ (Pathogenic bacteria) แบคทีเรียในสกุล Streptococcus มีบทบาทสำคัญในการผลิตเนยแข็ง เนยบางชนิด และผลิตภัณฑ์อาหารหมักอื่นๆ ได้แก่ *S. thermophillus, S. diacetlactic, S. lactis* และ *S. cremoris* เป็นต้น (Westhoff, 1998; George, 1983)

2.4.3. Leuconostoc

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีรูปร่างค่อนข้างกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสาย มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ Streptococcus แต่จัดเป็น Heterofermentative สามมารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาล เช่น *L. mesenteroides* สามารถเจริญที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 55-60 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารที่ให้กลิ่นรส ซึ่งประกอบไปด้วยไดอะซิทิลและอะซิโตอิน ทำให้ปริมาณกรดในผลิตภัณฑ์เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของของแบคทีเรียอื่นๆ ได้อย่างรวดเร็วกว่าแบคทีเรียแลคติก หรือแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องชนิดอื่นๆ แบคทีเรียในจีนัสนี้ไม่ก่อให้เกิดโรค (Nonpathogenic bacteria) พบตามบริเวณพื้นผิวของพืช

เชื้อ *Leuconostoc* spp.. เชื้อ *L. mesenteroides* มีความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์กระหล่ำปลีดองและแตงกวาดอง นอกจากนี้ยังร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในการสร้างกลิ่นรสที่ดีในผลิตภัณฑ์นมหมักอีกด้วย

2.4.4. Lactobacilli

แบคทีเรียกลุ่มนี้มีรูปร่างค่อนข้างกลม เรียงต่อกันเป็นสายเกือบทุกสายพันธุ์ ต้องการออกซิเจนในการเติบโตปริมาณน้อยมาก (Microaerophillic bacteria) หรือบางชนิดไม่ต้องการออกซิเจนเลย (strict anaerobes) เนื่องจากแบคทีเรียในสกุล Lactobacillus มีองค์ประกอบของดีเอนเอแตกต่างกันมาก แต่ละสายพันธุ์จึงมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป บางชนิดจัดเป็น Homofermentative และบางชนิดจัดเป็น Heterofermentative lactobacillus สามารถทนต่อสภาวะกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ สามารถเจริญที่พีเอชประมาณ 5 ดังนั้นโดยทั่วไปในการหมักแลคติกตามธรรมชาติ Lactobacilli สามารถดำเนินปฏิกิริยาการหมักต่อไป เมื่อค่าพีเอชลดลงเกินกว่าที่แบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆจะเจริญได้ แบคทีเรียในจีนัสนี้ไม่ก่อให้เกิดโรค พบอยู่ตามพื้นผิวของพืช ปุ๋ยจากมูลสัตว์ และน้ำนม

Lactobacilli ที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ *L. bugaricus, L. acidophilus* และ *L. brevis* เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และอีก 4 ชนิดเนื่องจากมีองค์ประกอบทางดีเอนเอที่ต่างกันแต่ละสายพันธุ์ จึงมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จึงถูกแยกออกมาจากกลุ่ม Lactobacilli และ Streptococci

2.4.5. Cambacterium

จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative แยกมาจาก Lactobacilli เช่น *C. divergens*, *C. mobile*

2.4.6. Vagococcus

จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative แยกมาจากกลุ่มของ Streptococci เช่น *V. luvialis* และ *V. salmoninarm*

2.4.7. Lactococcus

จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative แยกมาจากกลุ่มของ Streptococci

2.4.8. Enterococcus

แยกมาจากกลุ่มของ Streptococci

2.5. การหมักของแบคทีเรียแลคติก

การหมัก หมายถึง กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสารประกอบอินทรีย์ (เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน) โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ (หรือตัวเร่งทางชีวเคมี) ซึ่งผลิตมาจากจุลินทรีย์ชนิดที่จำเพาะ สำหรับความหมายของคำว่า อาหารหมัก (fermented foods) หมายถึง กลุ่มอาหารที่พิเศษกลุ่มหนึ่ง ซึ่งส่วนประกอบของอาหาร (คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน) ถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในสภาพที่ดีเหมาะสมต่อผู้บริโภค โดยอาศัยการหมัก แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังนี้คือ สภาพธรรมชาติของอาหาร ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม สำหรับอาหารหมักจำเป็นอย่างยิ่งที่เราจะต้องควบคุมชนิดของจุลินทรีย์ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบของจุลินทรีย์เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นไปตามต้องการ (วราวุฒิ, 2538) แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักจะถูกใช้ โดยเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียประเภท heterofermentative lactobacilli เช่น *Lactobacillus brevis* และประเภท homofermentative lactobacillus เช่น *Lactobacillus plantarum* และประเภท homofermentative cocci เช่น *Pediococcus pentosaceus* และ *Pediococcus acidilactici* จุลินทรีย์ดังกล่าวข้างต้นสามารถใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตในการผลิตกรด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก และมีผลทางอ้อมต่อกลิ่น รสชาติ และลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีปริมาณกรดแลคติกทั้งหมดเป็นร้อยละ 0.5-1.0 (คิดเทียบกรดแลคติก) และมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 4.45-4.55

การทำงานของแบคทีเรียแลคติกจะก่อให้เกิดกรดอย่างช้าๆ ปฏิกิริยาการหมักเริ่มตั้งแต่การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติก จนทำให้ความเป็นกรดด่างของอาหารลดลง สามารถแบ่งแบ่งเชื้อแบคทีเรียแลคติกตามลักษณะการหมักออกเป็น 2 ประเภท คือ Homofermentative และ Heterofermentative

2.5.1. Homofermentative

คือแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคศหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้กรดแลคติก 85- 95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อย ขั้นตอนการสร้างกรดแลคติกเริ่มต้นจากน้ำตาลแลคโตสจะผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแลคติก โดยเอนไซม์ที่อาศัยอยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมที่เรียกว่า Phosphenol-Pyruvate-Dependent Phosphotranferase System (PEP-PTS) ทำให้แลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟต(Phosphorylation) อยู่ในรูปของ lactose-6-phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ phsopho-β-galactosidase ไฮโดรไลซ์เป็น galactose-6-phosphate กับ glucose ซึ่งกลูโคสจะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่างๆของ Embden-Meyerhof-Pathway : (EMP Pathway) จนได้เป็นแลคเตทในขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งจะเปลี่ยนมาจากไพรูเวต โดยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ส่วน galactose-6-phosphate จะเข้าสู่กระบวนการต่างๆใน D-tagatose-6-phosphate pathway ได้เป็น tagatose-1,6-diphosphate และเปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone phosphate ท้ายสุดเอนไซม์ tagatose-1,6-aldolase ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น lyceraldehydes-3-phosphate โดยเอนไซม์ triosephosphate isomerase ซึ่ง lyceraldehydes-3-phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP pathway และเปลี่ยนเป็นแลคเตทในที่สุด

น้ำตาลกลูโคสจะสามารถเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแลคติกโดยอาศัยเอนไซม์ PEP-PTS ทำให้กลูโคสอยู่ในรูป glucose-6-phosphate ซึ่งเข้าสู่ EMP pathway ได้เป็นแลคเตทในที่สุด ส่วนน้ำตาลกาแลคโตสจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เมมแบรนได้เลย หลังจากถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ galactokinase ได้เป็น galactose-1-phosphate จากนั้นเข้าสู่ Leloir pathway จนได้เป็น glucose-1-phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ hexokinase phosphoglucomutase เปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate ซึ่งเป็นตัวกลางใน EMP pathway เปลี่ยนเป็นแลคเตทในที่สุด เชื้อแบคทีเรียที่มีการหมักแบบนี้ ได้แก่ *L. bugaricus, L. acidophilus, L. plantarum* และ *L. casei* เป็นต้น (Lawrence และ Terence, 1979) (ดังแสดงในรูปที่ 1)

2.5.2. Heterofermentative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมให้กรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างเช่น *Leuconostoc mesenteroides* (Tamine, 1981) แลคติกแอซิดกลุ่มนี้จะไม่มีเอนไซม์ aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส จึงทำให้ไม่สามารถย่อย fructose-6-phosphate ได้เป็น triose-phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ glucose-6-phosphate ได้เป็น 6-phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา decarboxylate ได้เป็น pentose-phosphate กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเปลี่ยนเป็น pentose-phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase โดยที่เปลี่ยนไปเป็น triose-phosphate และ acetyl-phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase โดยที่ triose-phosphate จะเปลี่ยนเป็นแลคเตทได้ ส่วน acetyl-phosphate จะเปลี่ยนเป็น acetyldehye และ ethanol นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกอาจจะใช้กระบวนการอื่นๆในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกลีเซอรอล เป็นต้น (ดังแสดงในรูปที่ 2)

2.6. การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆโดยแบคทีเรียแลคติก

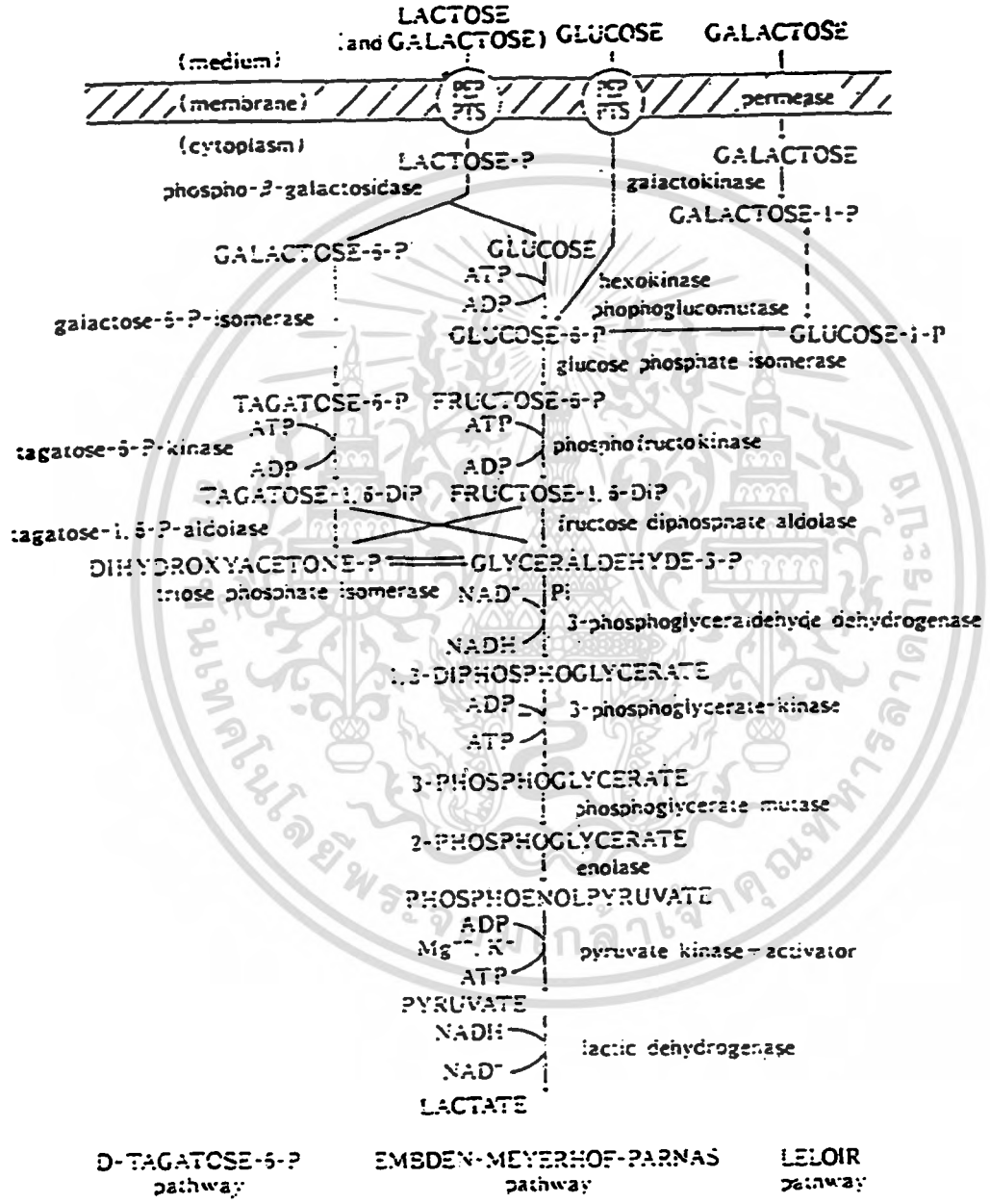
แบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ทำให้เพิ่มคุณภาพในการเก็บรักษา (keeping quality) และเพิ่มความปลอดภัยของอาหาร (safety) ได้ซึ่งมีปัจจัยต่างๆ ดังนี้ คือ

1) Hydrogen peroxide (H_2O_2)
2) Ethanol (C_2H_5OH)
3) การขาดแคลนอาหาร
4) มีค่า redox potential ต่ำ
5) ทำให้พีเอชของอาหารต่ำลง ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญและทำให้จุลินทรีย์ตัวอื่นตาย ผลิตกรดอินทรีย์ (Organic acid) หลายชนิด กรดอินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ต่างกัน
6) ผลิตแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งเป็นโมเลกุลของเปปไทด์หรือโปรตีน ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย

ผลของการถนอมอาหารของเชื้อแบคทีเรียแลคติกระหว่างการผลิต และการเก็บรักษาอาหารหมัก ที่สำคัญคือ สภาวะกรด โดยเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก การสร้างกรดนี้จะเป็นขั้นตอนแรกของการหมัก โดยการเปลี่ยนสารคาร์โบไฮเดรตในอาหารไปเป็นกรดอินทรีย์ (กรดแลคติก และกรดอะซิติก) โดยจะเกิดขึ้นพร้อมกับการลดลงของความเป็นกรดด่างของอาหาร มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มอายุการเก็บรักษา และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สุดท้าย นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียแลคติกยังสามารถผลิตและปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นนอกเหนือไปจากการสร้างกรดแลคติกและกรดอะซิติก ซึ่งสารเหล่านี้ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย เอธานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล อะซิโตอิน 2,3-บิวทาไดออล อะซิทัลดีไฮด์ เบนโซเอท เอนไซม์แบคเทอริโอไลติก แอนติไบโอติก และแบคเทอริโอซิน (Klaenhammer, 1988; Lindgren และ Dobrogosz, 1990; Schilling, 1990 และ Piard

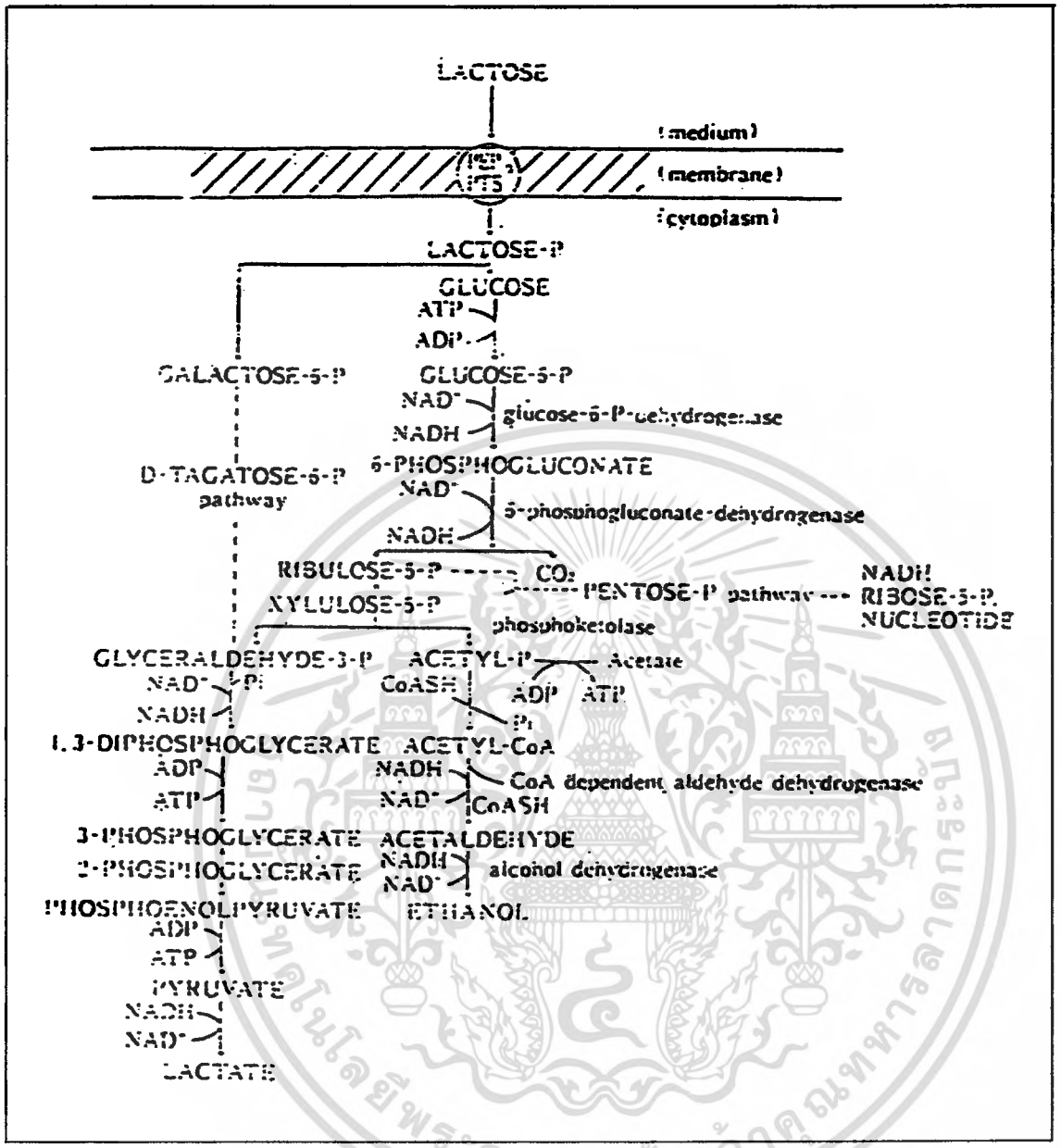
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ Desmazeaud, 1991) จากสารต่างๆทั้งหลายเหล่านี้จะขอกล่าวถึงแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารที่ได้ทำการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้



รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนกระบวนการหมักแบบ Homofermentative ของ LAB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนกระบวนการหมักแบบ Heterofermentative ของ LAB

แบคเทอริโอซิน จัดเป็นสารต่อต้านจุลชีพ(antimicrobial substances) ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เป็นสารประเภทโปรตีนและอาจมีคาร์โบไฮเดรตร่วมอยู่ด้วย มีขนาดใหญ่กว่าสารปฏิชีวนะและมีฤทธิ์ในการฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียที่มีภูมิรับไว (susceptible bacteria) และจำเพาะต่อบริเวณรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin receptor) บนเซลล์แบคทีเรียด้วย (Tagg และ คณะ, 1976) แบคทีเรียที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่างสายพันธุ์กัน จะมีผลต่อการยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่ใกล้ เคียงกัน มีลักษณะทางชีวเคมี พันธุศาสตร์คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอซินผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Lactobacillus fermentum, L. helviticus, L. acidophilus, P. pentosaceus* เป็นต้น ซึ่งมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Listeria monocytogenes* ดังนั้นแบคเทอริโอซินจึงจัดเป็นสารที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหาร

ในปี 1988 Klaenhammer ได้แบ่งสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกเป็น 2 ประเภทตามลักษณะผลการยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial spectrum) คือ

ประเภทที่ 1 สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน เช่น แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด

ประเภทที่ 2 สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด โดยมีผลยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes*

การแบ่งชนิดของแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียในกลุ่มต่างๆ ได้แก่

2.6.1. กลุ่ม Lactococcus

เริ่มใช้ยับยั้งครั้งแรก ค.ศ. 1930 โดยใช้เป็นหัวเชื้อของการผลิตเนยแข็งในอุตสาหกรรม พบว่า มีผลการยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกัน แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย Lactococcus ได้แก่ ไนซิน (Nisin), Diplococcin และ Lactostrepcins

Mattic and Hirsch (1974) เป็นผู้ตั้งชื่อไนซิน ที่เดิมมาจากคำว่า N-inhibitor substance เป็นสารที่ผลิตจากแบคทีเรีย *L. lastis* subsp. Lactis สามารถใช้ผลิตในทางการค้าในช่วงปี ค.ศ. 1950 และใช้ชื่อทางการค้าว่า Nisaplin สารประกอบของไนซินสามารถแยกได้ 5 ชนิด คือ Nisin A, B, C, D และ E Nisin A จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดและมักใช้ผลิตทางการค้า

ไนซินมีลักษณะเป็นโมเลกุลโพลีเปปไทด์สายตรง มีการต่อกันด้วยพันธะซัลเฟอร์ระหว่าง alanine กับ alanine เรียกว่า lanthionine และ aminobutyric acid (ABA) กับ alanine เรียกว่า β-methyl lanthionine ไนซินมีกรดอะมิโน 29-34 มีน้ำหนักโมเลกุล 7,000-10,000 ดาลตัน ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีน เช่น เอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ pancreatin เอนไซม์จากน้ำลายหรือกระเพาะสัตว์ ยกเว้นเอนไซม์เรนเนท มีคุณสมบัติในการละลายได้ดีที่ความเป็นกรดด่างต่ำ และคงตัวที่ความเป็นกรดด่าง 2.0 กล่าวคือสามารถนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยไม่สูญเสียกิจกรรม แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของไนซินยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด คาดว่าไนซินจะมีผลต่อไซโตพลาสมิกเมมแบรนโดยการจับอิออนบาก เช่น Lactobacillus, Streptococcus, Bacillus และ Clostridium ในปัจจุบันไนซินใช้เป็นยาปฏิชีวนะที่ยอมรับในการเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหาร (Liu และ Hanson, 1990) และมีการรายงานการตรวจพบจากแหนมแล้วคือ Nisin Z

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2. กลุ่ม Pediococcus

Pediococcus pentosaceas FBB-61 ที่แยกได้จากแตงกวาดองจะสร้างแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า Pediocin A มีความสามารถในการยับยั้ง *Pediococcus sp., S. aureus, Cl. Sporogenenes, Lb. Brevis, Lb. Lactis ssp.*,Lactic ATTC 11454(Klenhammer, 1985) ขณะที่ Pediocin PA-1 สามารถได้จาก *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16,500 ดาลตัน ถูกทำลายโดยเอนไซม์ pronase, papain, pepsin และ Alpha-chymotripsin แต่มีความคงตัวที่ความร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม Pediococcus, Lactobacillus บางชนิดและ *L. mesenteroides spp.* Dextranicum แต่ไม่มีผลต่อ Lactococcus (Gonzales และ Kunk, 1987) ส่วน Pediocin ACH เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *P. acidilactici* H มีน้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตัน และถูกทำลายโดยเอนไซม์ trysin, chymotrypsin, ficin และ papain สามารถนึ่งฆ่าเชื้อได้ดีที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยไม่สูญเสียกิจกรรม และทนต่อสารละลายอินทรีย์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆได้ดีที่พีเอช 2.5-9.0 (Bhunia และคณะ, 1987) และสามารถยับยั้ง *Listeria* spp. ได้ทุกสายพันธุ์ แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ (Motlagh และคณะ, 1991)

ต่อมามีการรายงานผลการศึกษาแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *P. acidilactici* ที่แยกจากการผลิตแหนมว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค และทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสียหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก *Listeria monocytogenes, L. innocua, L. ivanovii, Enterococcus faecalis, Cl. Perfringens, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* และแบคทีเรียแกรมลบ *Samonella enteritidis* และ *S. derby*

2.6.3. กลุ่ม Leuconostoc

สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม Leuconostoc สิ่งที่สร้างขึ้นมา ได้แก่ กรดแลคติก, กรดอะซิติก และไดอะเซทิล นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีลักษณะคล้ายแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin-like-substance) Orberg และ Sandine (1984) ได้ทำการทดลองพบว่า *Leuconostoc sp.* PO 184 สามารถยับยั้ง *Streptococcus cremoris* U 134 ได้ แต่ไม่มีผลต่อ *S. lactic* ATTC 11454 นอกจากนี้ Sandine(1987) ยังพบการถ่ายทอดดีเอนเอโดยวิธีคอนจูเกชั่นของ *S. lactic* 7962 กับ *L. dextranicum* ผลการทดลองพบว่า คอนจูแกนท์ของเชื้อผู้รับ *L. dextranicum* จะสามารถสร้างไนซินได้ดีกว่าStreptococcus ถึง 1,000 เท่า

สารต่อต้านจุลชีพที่เราใช้ในการถนอมอาหาร อาจจะทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์หรือทำลายจุลินทรีย์ ลักษณะในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพอาจแบ่งได้เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) การทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายความสามารถในการผ่านเข้าออกของสาร (Permeability) และทำให้ลักษณะของเซลล์เสียความสมดุลไป โดยปกติสารต่อต้านจุลชีพจะทำปฏิกิริยาที่บริเวณไม่จำเพาะบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เสียความสามารถในการทำงาน เช่น ความสามารถในการต่อต้านของจุลชีพที่มีลักษณะเป็น hydrophobic compounds จะกำจัดการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสารต่อต้านจุลชีพนี้ สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ในชั้น lipolysaccaride ได้ง่าย
2) ทำให้เอนไซม์บางชนิดทำงานไม่ได้
3) ทำให้สารพันธุกรรมเสียรูปร่าง หรือทำหน้าที่ผิดไปจากเดิม

อย่างไรก็ตาม ได้มีการสนใจนำแบคทีเรีย ไปใช้ในอาหารสำหรับมนุษย์มากกว่าแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆ มีการนำสารโมเลกุลใหญ่ดังกล่าวไปใช้กันในวิชาวิทยาศาสตร์ การถนอมอาหาร และกระบวนการทางเป้าหมายของส่วนแบ่งทางเศรษฐกิจ เป็นทางเลือกใหม่แทนสารเคมีถนอมอาหาร

2.7. เชื้อแบคทีเรียในจีเนียสลิสทีเรีย (Genus Listeria)

การทดลองนี้ได้ทำการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียแลคติก โดยใช้เชื้อ *Listeria innocua* เป็นตัวทดสอบ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่ที่เลือกใช้เชื้อตัวนี้ ก็เพราะไม่เป็นอันตรายต่อผู้ทำการทดลองและมีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับ *Listeria monocytogenes* โดยอยู่ในจีเนียสเดียวกันน่าจะให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงหรือเหมือนกัน ถ้าการตรวจสอบให้ผลออกมาว่า แบคเทอริโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria innocua* ก็สามารถกล่าวได้ว่าแบคเทอริโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria monocytogenes* ได้เช่นกัน

Listeria monocytogenes คือเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลิสเตอริโอซีส (Listeriosis) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก แอร์โรฟิลิค ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นแท่งขนาด 0.5 x 0.8 – 2.5 ไมโครเมตร เซลล์อาจเรียงตัวต่อกันเป็นสาย เคลื่อนที่ได้เล็กน้อยโดยใช้แฟคเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ พบว่าโรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประมาณ 26 สปีชีส์ รวมทั้งคน และเกิดในนกด้วย แหล่งที่แพร่กระจายเชื้ออาจมาจากสัตว์ป่าที่เป็นโรค แล้วนำโรคมาติดสัตว์เลี้ยงตามบ้านและคน ซึ่งกลไกในการถ่ายทอดเชื้อยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ลักษณะของโรคจะมีอาการทางประสาทในระยะแรก และมีอาการของ acute encephalitis ตามมาด้วยอวัยวะภายในหลายแห่งอาจแสดงอาการของโรคได้ และเมื่อตรวจเลือดจะพบเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของโรค ถ้าเกิดในผู้ชายจะเป็นโรคไข้สมองอักเสบ ถ้าเกิดในผู้หญิงอาจทำให้เกิดการแท้งบุตรได้ หรือบุตรที่เกิดมาจะมีการพัฒนาทางสมองช้า รวมทั้งอาจแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96859

เชื้อได้จาก cerebrospinal fluid ด้วย การรักษาทำโดยใช้สารปฏิชีวนะเตตระไซคลินในการรักษา (อภิญญา)

2.7. ปัญหาของผลิตภัณฑ์แหนม

2.7.1. คุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่สม่ำเสมอ

คุณภาพของผลิตภัณฑ์มีความผันแปรจากชุดหนึ่งไปยังชุดหนึ่ง และระยะเวลาที่ใช้ในการหมักไม่สามารถคาดคะเนได้เพราะการหมักของแหนมขึ้นอยู่กับเชื้อที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติกในวัตถุดิบแต่ละแห่งมีปริมาณเชื้อที่แตกต่างกันทั้งชนิด และปริมาณ นอกจากนี้อาจมีจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการปนเปื้อนมาซึ่งล้วนแต่มีผลต่อคุณภาพของแหนม แบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติโดดเด่นในการผลิตกรด บางสายพันธุ์ให้กลิ่นรส ซึ่งความแตกต่างกันของเชื้อจะทำให้แหนมมีความแตกต่างกันด้านคุณภาพ ดังนั้นผู้ประกอบการอุตสาหกรรมการผลิตแหนมจึงมีความเสี่ยงต่อการผลิต และอาจจะไม่ได้ผลิตภัณฑ์ตามคุณภาพต้องการในแต่ละรุ่นที่ผลิต

2.7.2. ความปลอดภัยของผู้บริโภคในการบริโภคผลิตภัณฑ์แหนม

ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในการหมักแหนมตามธรรมชาติอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้การหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ซึ่งอาจทำให้เชื้อโรคสามารถเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้ก่อนที่แบคทีเรียแลคติกจะเจริญเติบโตขึ้นมาภายหลัง และสร้างแบคเทอริโอซิน อีกทั้งส่วนใหญ่การบริโภคแหนมบริโภคโดยไม่ผ่านความร้อนในการทำให้สุก ดังนั้นการควบคุมคุณภาพของแหนมให้มีความปลอดภัยสูงจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อผู้บริโภคแหนมในลักษณะดังกล่าว

2.7.2.1. แหล่งของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในผลิตภัณฑ์แหนม

ก. วัตถุดิบ จุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบมีทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษขึ้นอยู่ กับว่าจะได้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดมา และมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์มากน้อยเพียงใด เช่น เนื้อหมูมีการปนเปื้อนแบคทีเรียที่สามารถสร้างพิษได้ คือ Samonella เป็นต้น

ข. ภาชนะเครื่องมือเครื่องใช้ อากาศ และการผลิตแหนมในสภาพที่ไม่ถูกสุขาภิบาลอาหาร

ค. ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการหมักแหนมตามธรรมชาติอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการหมักได้อย่างสมบรูณ์ ซึ่งทำให้ได้แบคทีเรียชนิดที่สร้างสารพิษปนเปื้อนมากับวัตถุดิบนั้นสามารถเจริญและสร้างสารพิษก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

ง. พนักงานที่ทำการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ. พฤติกรรมการบริโภคแหนม ถ้านิยมบริโภคแหนมในรูปแหนมดิบที่ไม่ผ่านการทำให้สุกด้วยความร้อน จะทำให้ไม่สามารถทำลายหรือลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่เป็นพิษที่ปนเปื้อนมาในแหนมได้

2.7.2.2. จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในการบริโภคผลิตภัณฑ์แหนม

อดิศร (2533) ตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลา (Salmonella) ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างแหนมตามธรรมชาติที่ทำการหมักโดยการเติมและไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกผสม (LP) พบว่าแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อก่อนทำการหมักจะตรวจไม่พบเชื้อซาลโมเนลลา ในวันที่ 6 ของการหมัก ส่วนแหนมที่เติมกล้าเชื้อผสมLP จะตรวจไม่พบเชื้อซาลโมเนลลา ในวันที่ 5 ของการหมัก แสดงว่าแหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อซาลโมเนลลาได้ดีกว่าแหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อซาลโมเนลลา ที่ตรวจพบในวันที่ 4 และ 5 ของการหมักจะเป็น *S. anatum* ซึ่งทนต่อการทำลายของสารยับยั้งต่างๆ ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกได้ดีในขณะเกิดกระบวนการหมัก และจากการทดลองตรวจหาเชื้อซาลโมเนลลาตามธรรมชาติในตัวอย่างแหนม พบว่าตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา ได้ถึง 16 เซโรไทป์ โดยที่ *S. derby* เป็นเซโรไทป์ที่ตรวจพบมากที่สุด รองลงมาคือ *S. anatum* และ *S. krefeld* ตามลำดับ

2.7.3. อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์แหนม

ผลิตภัณฑ์แหนมมีอายุการเก็บรักษาค่อนข้างสั้นประมาณ 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง เพราะมีความเหมาะสมต่อการเกิดกระบวนการหมัก ถ้าหากเก็บไว้นานกว่านี้โดยไม่นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ จะเกิดรสเปรี้ยวเกินไป สีเปลี่ยนและเกิดกลิ่นไม่ดี ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ปกติผลิตภัณฑ์แหนมมักจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นตลาดของผลิตภัณฑ์แหนมต้องการให้มีอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้น

2.7.4. กระบวนการหมักผลิตภัณฑ์แหนมไม่สามารถควบคุมได้

เนื่องจากผู้ประกอบการยังขาดความรู้ความเข้าใจและเทคโนโลยีที่เกี่ยงข้องกับการหมัก ดังนั้นจึงควรจะมีการศึกษาและปรับปรุงวิธีการควบคุมกระบวนการการหมัก เพื่อให้แหนมมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม สามารถบริโภคได้และมีคุณภาพสม่ำเสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1. อุปกรณ์

- มีด
- เขียง
- หม้อสแตนแลส
- กะละมังพลาสติก
- ถุงร้อน (ขนาด 3 x 5)
- ยางรัดถุงพลาสติก
- มีดโกน
- กระชอน
- ช้อนตักสาร
- ที่ใส่หลอดทดลอง (rack)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ขวดน้ำกลั่น
- ลูกยาง
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
- ถุง stomacher

3.1.2. เครื่องแก้ว

- ปีเปต (pipette) ขนาด 0.1 และ 10 มิลลิลิตร
- หลอดทดลอง (test tubes)ขนาด 16 x 150
- บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 250 และ 1000 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
- จานเพาะเชื้อ (prtri dish)
- แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
- บิวเรต (burette) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- ขาตั้งบิวเรต (stand)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3. เครื่องมือ

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องบดเนื้อหมู
- เครื่องปั่น (blender)
- เครื่อง stomacher
- เตาแก๊ซ
- หม้อหุงข้าว
- เตาอบไมโครเวฟ
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- ตู้ปลอดเชื้อ (larmina flow)
- ตู้แช่เย็น
- เครื่อง autoclave
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)
- water bath
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (vortex)
- ตู้บ่มเชื้อของ Memmert

3.1.4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- MRS Broth ของบริษัท Merck, Germany
- TSB (Trypicase Soy Broth) ของบริษัท Merck, Germany
- LAA (Lactobacilli Agar AOAC) ของบริษัท Difco
- Peptone ของบริษัท Merck, Germany
- Meat extract ของบริษัท Merck, Germany
- Agar ของบริษัท Merck, Germany

3.1.5. สารเคมี

- Sodium tripolyphosphate
- Sodium ascobate
- Sodium nitrite
- Standardized Sodium hydroxide (1 N)
- Phenolpthalein 1 % indicator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

- Buffer pH 4.00 และ pH 7.00

3.1.6. วัตถุดิบ

- กระเทียม
- ข้าวสุก
- เนื้อหมู (สะโพก)
- หนังหมูหั่นขนาด 2 x 3 x 20 มม.
- เกลือ

3.1.7. จุลินทรีย์

- *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536
- *Lactococcus lactis* รหัส N190
- *Listeria innocua* (LTH 3096) จาก Faculty of Food Thechnology Hohenheim University, Germany

3.2. ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.2.1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใส่ในตัวอย่างแหนม

3.2.1.1. เชื้อ *Listeria innocua* ถ่ายเชื้อที่เก็บไว้ลงในอาหารเหลว TSB (Trypicase Soy Broth) 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. นำออกมาจากตู้บ่มเชื้อ แล้วใช้ Loop เขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อลงใน TSB อีกครั้ง เพื่อให้มีปริมาณเชื้อ 10^6 cfu/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. แล้วจึงนำไปใช้ได้

3.2.1.2. แบคทีเรียแลคติกทั้งสองตัวคือ TISTR 536 และ N190 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. นำออกมาจากตู้บ่มเชื้อ แล้วใช้ Loopเขี่ยเชื้อถ่ายเชื้อลงใน MRS อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. แล้วจึงนำไปใช้ได้ โดยดูดมา 0.1 มล. แล้วเติมลงในแหนม เพื่อให้แหนมมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/g

3.2.2. การเตรียมตัวอย่างแหนม

ส่วนผสม :

1. เนื้อหมูบด	650 กรัม
2. หนังหมูหั่นขนาด 2 x 3 x 20 mm	350 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ข้าวหุงสุก	60	กรัม
4. กระเทียมบดละเอียด	50	กรัม
5. เกลือ	25	กรัม
6. Sodium tripolyphosphate	3	กรัม
7. Sodium ascobate	0.5	กรัม
8. Sodium nitrite	0.1	กรัม

วิธีทำ

3.2.2.1. เนื้อหมูเอามันและพังพืดออกให้หมด แล้วจึงนำไปบด

3.2.2.2. หนังหมูนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ยกขึ้นนำไปล้างในน้ำเย็น โกนขนออก แล้วหั่นให้มีขนาดที่กำหนด

3.2.2.3. ข้าวหุงสุกใช้อัตราส่วนของข้าว 300 กรัม ต่อน้ำ 600 มล.

3.2.2.4. ขั้นตอนการผสมให้นำเนื้อบดมาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันกับหนังหมูก่อน แล้วจึงเติมส่วนที่เป็น ข้าวสุก กระเทียม และเครื่องปรุง ลงไปตามลำดับ คลุกเคล้าให้เข้ากัน

3.2.2.5. บรรจุแหนมลงในถุงพลาสติกให้มีน้ำหนัก 10 กรัม ส่วนแหนมที่ต้องเติมเชื้อให้ดูดเชื้อมา 0.1 มล. ใส่ลงในแหนม คลุกเคล้าให้เชื้อกระจายโดยการขยำจากนอกถุงพลาสติก เสร็จแล้วมัดถุงให้แน่น จะได้เป็นผลิตภัณฑ์แหนมตุ้ม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง

แบ่งแหนมออกเป็น 3 กลุ่ม

<u>กลุ่มที่ 1</u> ทำการวัดค่าพีเอชและวิเคราะห์หาปริมาณเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (acidity) ในช่วงระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของการผลิตกรดแลคติกของแหนม 3 treatment (treatment ละ 21 ตุ้ม) ซึ่งประกอบไปด้วย

treatment ที่ 1 ไม่เติมกล้าเชื้อ (control)

treatment ที่ 2 เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536

treatment ที่ 3 เติมกล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* รหัส N190

<u>กลุ่มที่ 2</u> ทำการตรวจสอบความคงทน และความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของแบคเทอริโอซินที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น ในช่วงระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 เพื่อเปรียบเทียบแหนมทั้ง 3 treatment (เหมือนในกลุ่มที่ 1 แต่ treatment ละ 7 ตุ้ม)

<u>กลุ่มที่ 3</u> ทำการประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของแหนมทั้ง 3 treatment (เหมือนในกลุ่มที่ 1 แต่ treatment ละ 30 ตุ้ม) ด้วยวิธี Hedonic scale

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3. ศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* และ *Lactococcus lactis* ที่มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงและเปรียบเทียบกับแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก

3.2.3.1. การเก็บตัวอย่างและการวัดค่าพีเอช

ก. เก็บตัวอย่างมาจากแหนมทั้ง 3 treatment จากช่วงระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 โดยเก็บมาตัวอย่างละ 20 กรัม (2 ตุ้ม)

ข. เติมน้ำกลั่นลงไป 10 มล. ต่อแหนม 20 กรัม

ค. นำเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH-meter บันทึกผลและนำผลค่าพีเอชที่วัดได้จากช่วงระยะเวลาการหมักแหนมต่างๆมาทำการเปรียบเทียบระหว่าง treatment เดียวกัน และ ต่าง treatment ด้วย

3.2.3.2. การเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์หาปริมาณเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (acidity)

ก. เก็บตัวอย่างแหนมทั้ง 3 treatment จากช่วงระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 โดยเก็บมาตัวอย่างละ 10 กรัม (1 ตุ้ม)

ข. เติมน้ำกลั่นลงไป 10 มล. ต่อแหนม 10 กรัม

ค. นำเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำไปไทเทรตกับ Standardized Sodium hydroxide (1 N) จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน โดยใช้ Phenolpthalein 1 % (1-2 หยด) เป็นอินดิเคเตอร์

ง. บันทึกผลและนำผลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (acidity) จากสูตร

$$\% \text{ ความเป็นกรด} = \frac{\text{ml. NaOH x Normorlity NaOH x Equivalent wt.of acid x 100}}{\text{ml. (or gm.) sample x 100}}$$

จ. บันทึกผลและนำผลค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดที่คำนวณได้จากช่วงระยะเวลาการหมักแหนมต่างๆ มาทำการเปรียบเทียบระหว่าง treatment เดียวกัน และต่าง treatment ด้วย

3.2.4. ศึกษาความผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* และ *Lactococcus lactis* ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน โดยตรวจสอบความคงทนและความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ในแหนมและทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4.1. การเตรียมจานเพาะเชื้อเพื่อใช้ตรวจสอบแบคเทอริโอซิน

ก. เทอาหารแข็ง NA ที่ผ่านการหลอมเหลวด้วยความร้อน ลงบนจานเพาะเชื้อ(อบฆ่าเชื้อแล้ว) ทิ้งไว้ให้เย็นจนอาหารแข็งตัว

ข. เชื้อ *Listeria innocua* ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว TSB ดูดมา 10 µl ด้วยไมโครปิเปต แล้วใส่ลงในอาหารแข็ง LAA ที่ผ่านการหลอมเหลวด้วยความร้อน ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง vortex เพื่อให้เชื้อกระจายตัว แล้วเทลงบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ ก. ทิ้งไว้ให้เย็นจนอาหารแข็งตัว นำไปใช้ได้ อาหารเลี้ยงเชื้อจะมี 2 ชั้นเพื่อให้เป็นการง่ายต่อการสังเกต clear zone

3.2.4.2. การเตรียมตัวอย่างแหนมและการตรวจสอบความคงทนและความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของแบคเทอริโอซิน

ก. เก็บตัวอย่างแหนมทั้ง 3 treatment จากช่วงระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 โดยเก็บมาตัวอย่างละ 10 กรัม (1 ตุ้ม)

ข. เติมน้ำสเตอไรล์ลงไป10 มล.ต่อแหนม 10 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยมือ โดยขยำนอกถุงพลาสติก

ค. เทเอาแต่ส่วนที่เป็นน้ำลงในหลอดสเตอไรล์

ง. นำน้ำสกัดแหนมที่ได้ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

จ. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง vortex ทิ้งให้สารแขวนลอยตกตะกอน แยกเอาส่วนที่เป็นสารละลายใสไปตรวจสอบ

ฉ. ดูดเอาสารละลายใสมา 100 µl ด้วยไมโครปิเปต ใส่ลงในหลอดพลาสติกสเตอไรล์ที่มีน้ำสเตอไรล์อยู่ 100 µl เพื่อเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 1:1

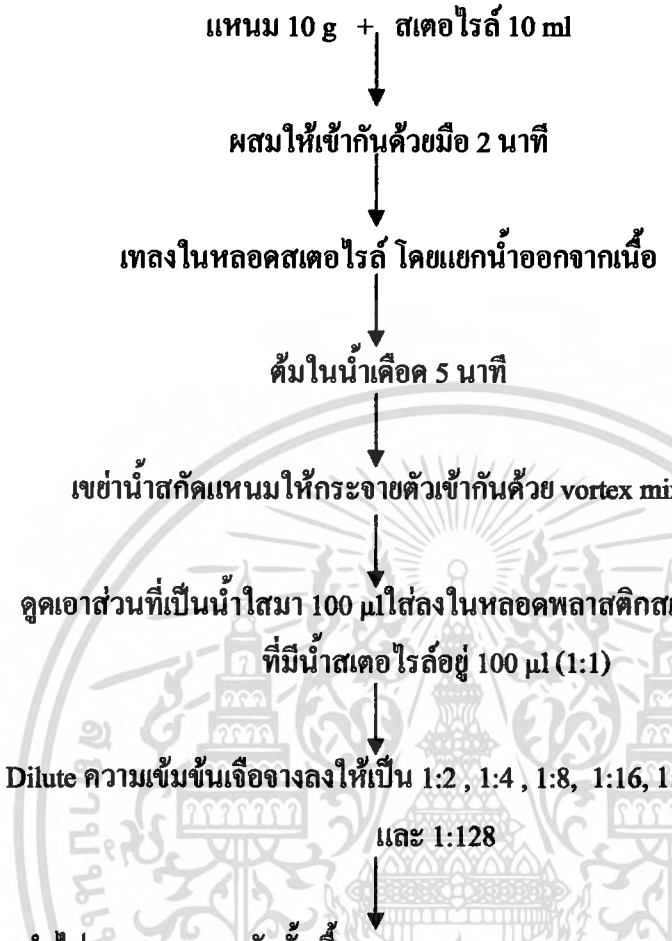
ช. ดูดเอาสารละลายที่เจือจางแล้วในข้อ ฉ. มา 100 µl เจือจางในน้ำสเตอไรไรล์ 100 µl อีกครั้งเพื่อให้มีความเข้มข้นเป็น 1:2 ทำอย่างนี้ไปเรื่อยๆ จนได้สารละลายที่นำไปตรวจสอบแบคเทอริโอซินมีความเข้มข้นเป็น 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ

ซ. หยดสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ 1 หยดลงบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.4.1. (ข.) จนครบ

ฌ. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชม. ถ้าหากมี clear zone แสดงว่า แหนมสร้างแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Listeria innocua*

ญ. บันทึกผลและนำผลการทดลองที่ได้จากช่วงระยะเวลาการหมักแหนมต่างๆมาเปรียบเทียบกัน ระหว่าง treatment เดียวกัน และต่าง treatment ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของแบคเทอริโอซิน

3.2.5. ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้กล้าเชื้อแลคติกในการหมักแหนมเชิงการค้าต่อไป โดยทำการประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของแหนมทั้ง 3 แบบ ด้วยวิธี Hedonic scale ศึกษารสชาติที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากที่สุด โดยพิจารณาปัจจัยคุณภาพทางประสาทสัมผัส คือ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส ความเปรี้ยว รสชาติ ความชอบรวม ของแหนมที่หมักโดยกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 และ *Lactococcus lactis* รหัส N190 และแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก โดยใช้วิธี Hedonic scale ใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝนและชอบบริโภคแหนมจำนวน 30 คน วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) คำนวณโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาในการทำการทดลอง

ใช้ระยะเวลาในการทดลองโดยเริ่มตั้งแต่วันที่ 15 พฤษภาคม พ.ศ. 2547 ถึงวันที่ 4 ตุลาคม พ.ศ. 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

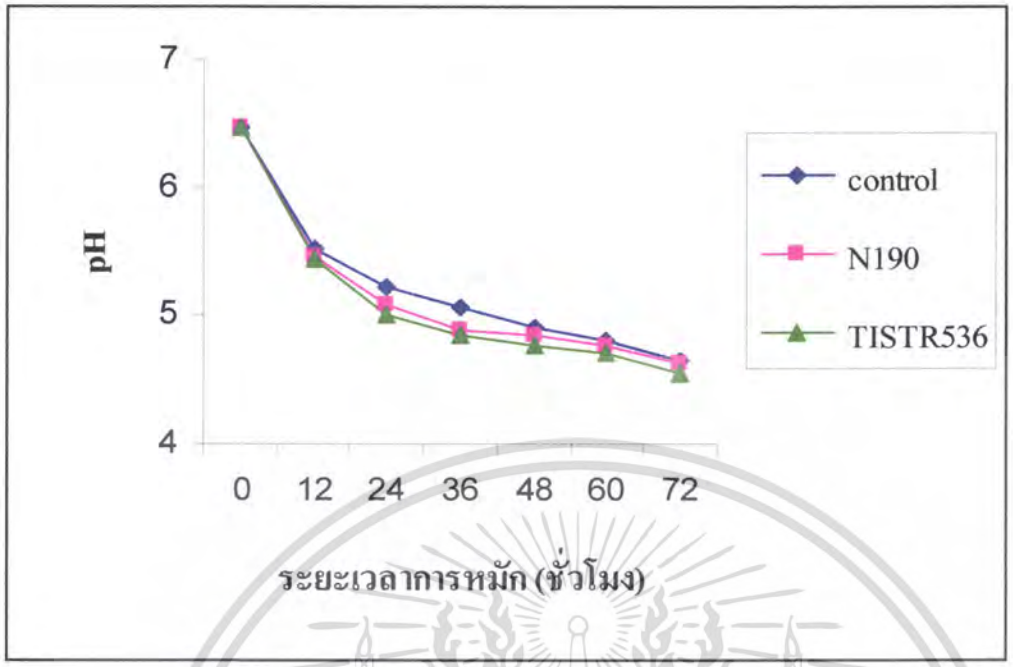
4.1. ผลการศึกษาการลดลงของพีเอชและค่าเปอร์เซ็นต์กรดในตัวอย่างแหนม

การผลการทดลองตรวจวัดค่าความเป็นกรดด่างของตัวอย่างแหนมด้วยเครื่อง pH-meter พบว่ามีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น โดยค่าพีเอชเฉลี่ยที่วัดได้จากช่วงระยะเวลาการหมักแหนมชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ของตัวอย่างแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อหรือcontrol นั้น มีค่าเท่ากับ 6.47, 5.52, 5.22, 5.06, 4.90, 4.80 และ 4.66 ตามลำดับ ในตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* รหัส N190 มีค่าเท่ากับ 6.47, 5.46, 5.09, 4.89, 4.84, 4.76 และ 4.64 ตามลำดับ และในตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 มีค่าเท่ากับ 6.47, 5.45, 5.00, 4.85, 4.76, 4.71 และ 4.56 ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบแนวโน้มการลดลงของค่าพีเอชจากตัวอย่างแหนมทั้ง 3 treatment จะเห็นว่าตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีแนวโน้มการลดลงของค่าพีเอชใกล้เคียงกัน คือ ค่าพีเอชจะลดลงอย่างมากและรวดเร็ว ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างแหนมแบบ control ที่อัตราการลดลงของค่าพีเอชน้อยและช้ากว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก จากกราฟในรูปที่ 3 จะเห็นว่าค่าพีเอชมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงที่ 12 ถึง 24 และจะลดลงอย่างช้าๆ ภายหลังจากชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่คำนวณได้ (ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3) จะเห็นว่ามีความสอดคล้องกัน คือ ค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่คำนวณได้จากตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 ในช่วงระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 มีค่ามากกว่าเปอร์เซ็นต์กรดของตัวอย่างแหนมแบบ control ในขณะที่ค่าเปอร์เซ็นต์กรดในช่วงระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงที่เหลือ ค่าที่คำนวณได้มีค่าเท่ากัน จึงกล่าวได้ว่าแหนมที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดแลคติกได้เร็วกว่าและมากกว่าแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

ชม. ที่ / Treatment	0	12	24	36	48	60	72
Control	6.47	5.52	5.22	5.06	4.90	4.80	4.66
N190	6.47	5.46	5.09	4.89	4.84	4.76	4.64
TISTR536	6.47	5.45	5.00	4.85	4.76	4.71	4.56

ตารางที่ 1 แสดงค่าพีเอชเฉลี่ยในตัวอย่างแหนมที่วัดได้ในระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 กราฟเปรียบเทียบแนวโน้มการลดลงของค่าพีเอชในตัวอย่างแหนม ในระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงต่างๆ

ชั่วโมงที่	ปริมาณNaOH ที่ไทเทรต	ค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่คำนวณได้
0	0.3	2.7
12	0.4	3.6
24	0.5	4.5
36	0.6	5.4
48	0.7	6.3
60	0.7	6.3
72	0.8	7.2

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณของ NaOH ที่ไทเทรตได้ และค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่คำนวณได้ในระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงต่างๆ จากตัวอย่างแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ (control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงที่	ปริมาณNaOH ที่ไทเทรต	ค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่คำนวณได้(%)
0	0.3	2.7
12	0.5	4.5
24	0.6	5.4
36	0.6	5.4
48	0.7	6.3
60	0.7	6.3
72	0.8	7.2

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณของ NaOH ที่ไทเทรตได้ และค่าเปอร์เซ็นต์กรดที่คำนวณได้ในระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงต่างๆ จากตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536

4.2. ผลการศึกษาความคงทนและความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของแบคเทอริโอซินที่ สร้างจากกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เติมลงในตัวอย่างแหนม

จากผลการทดลองการตรวจสอบความคงทน และความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของแบคเทอริโอซินที่ สร้างจากกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่เติมลงในตัวอย่างแหนม พบว่า ตัวอย่างแหนมที่มีการเติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ได้เพียงตัวเดียว จากตารางที่ 4 เมื่อพิจารณาช่วงระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงต่างๆ จะเห็นว่า ชั่วโมงที่ 0 ไม่สังเกตพบ clear zone เลย แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกยังไม่สร้างแบคเทอริโอซิน แต่เมื่อหมักแหนมเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป สามารถสังเกต clear zone เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ แสดงว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งมีการสร้างแบคเทอริโอซินมากที่สุดเมื่อระยะเวลาการหมักแหนมอยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 48-60 และการสร้างแบคเทอริโอซินจะเริ่มลดลง ภายหลังจากหมักแหนมเป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมงเป็นต้นไป ซึ่งเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้น จะเห็นได้ว่าสารละลายน้ำสกัดจากแหนมที่มีความเข้มข้นมาก (เจือจางน้อย) จะสามารถสังเกตเห็น clear zone ได้ชัดเจน และจะสังเกตเห็น clear zone ได้ชัดน้อยลงเมื่อสารละลายน้ำสกัดจากแหนมมีความเข้มข้นน้อยลง (เจือจางมาก) จึงกล่าวได้ว่าที่ระยะเวลาการหมักแหนมชั่วโมงที่ 48 ถึง 60 แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ได้มากที่สุด เพราะที่ช่วงระยะเวลานี้ถึงแม้ว่าสารละลายน้ำสกัดจากแหนมจะถูกเจือจางมากจนมีความเข้มข้นเพียง 1:32 แต่ก็ยังสามารถสังเกตเห็น clear zone ได้อยู่ ส่วนตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Lactococcus lactis* รหัส N190 ไม่สามารถสังเกตเห็น clear zone ได้นั้น ทั้งที่จัดเป็นแบคทีเรียแลคติกเหมือนกับ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 อาจจะมีผลเนื่องมาจาก Nisin ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ *Lactococcus lactis* รหัส N190 สร้างขึ้นนั้นมีการสลายตัวในระหว่างการหมักเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส ที่มีในเนื้อหมู(Roseและคณะ, 1999) จึงทำให้ไม่สามารถตรวจสอบแบคเทอริโอซินได้ และตัวอย่างแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อนั้นไม่สามารถสังเกตเห็น clear zone ได้เพราะว่าไม่มีแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้เกิดขึ้นในกระบวนการหมักแหนม จึงทำให้ไม่สามารถตรวจสอบแบคเทอริโอซินได้เช่นกัน

ความเข้มข้น / ชม. ที่	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
0	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	+	-	-	-
24	+	+	+	+	+	+	-	-
36	+	+	+	+	+	+	-	-
48	+	+	+	+	+	+	+	-
60	+	+	+	+	+	+	+	-
72	+	+	+	+	+	+	-	-

\+ เกิด clear zone

\- ไม่เกิด clear zone

ตารางที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 ที่เติมลงไปในตัวอย่างแหนม ในระยะเวลาการหมักแหนมที่ชั่วโมงต่างๆ

4.3. ผลการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 ในการหมักแหนมเชิงการค้า

จากผลการประเมินการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนม โดยใช้แผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Desing (RCBD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย พบว่าในด้านสี กลิ่น เนื้อสัมผัส ของแหนมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 กับตัวอย่างแหนมแบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ แต่จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในด้านความเปรี้ยว รสชาติ และความชอบรวม เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของคะแนน พบว่าค่าเฉลี่ยคะแนนในด้านความเปรี้ยว รสชาติ และความชอบรวม ของตัวอย่างแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 มีค่ามากกว่าตัวอย่างแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ ทั้ง 3 ด้าน แสดงว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 มากกว่า เนื่องจากกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใส่ลงไปในแหนม สร้างกรดแลคติกได้มากกว่าแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่เติมกล้าเชื้อ จึงถือว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์นี้ไปใช้ในการผลิตเชิงการค้าเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์แหนม เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต เพิ่มความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภค ลดการใช้สารเคมีที่ใช้ทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ลดค่าใช้จ่ายในการผลิต และปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้เร็วขึ้น

ปัจจัย / Treatment	Control	TISTR 536
สี	3.50[a]	3.43[a]
กลิ่น	3.27[a]	3.27[a]
เนื้อสัมผัส	3.27[a]	3.27[a]
ความเปรี้ยว	3.27[b]	3.83[b*]
รสชาติ	3.23[b]	4.03[b*]
ความชอบโดยรวม	3.23[b]	3.97[b*]

a = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น95 เปอร์เซ็นต์

b = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 แสดงผลทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1. สรุปผลการทดลอง

จากการเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลคติกลงในผลิตภัณฑ์แหนมในการทดลองครั้งนี้ มีความเป็นไปได้สูง ที่จะนำกล้าเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลคติกไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์แหนมในเชิงการค้า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 ซึ่งผลิตสารแบคเทอริโอซิน คือ Pediocin PA-1 ที่จะให้ผลดีกว่า *Lactococcus lactis* รหัส N190 ซึ่งผลิตสารในกลุ่ม Nisin เพราะแบคเทอริโอซินที่ TISTR 536 ผลิตขึ้นมีความคงทนไม่สลายในระหว่างการหมัก และยังทำให้แหนมมีรสชาติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค มีความเปรี้ยวมากกว่าแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อเนื่องมาจากแบคทีเรียแลคติก สามารถผลิตกรดได้เร็วกว่าและมากกว่า นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเพราะการผลิตกรดที่เร็ว จะช่วยร่นระยะเวลาในการหมักแหนมทำให้สามารถผลิตแหนมออกจำหน่ายได้เร็วขึ้น ลดต้นทุนในการผลิต และที่สำคัญก็คือกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536ที่เติมลงไปผลิตแบคเทอริโอซินจึงทำให้ผลิตภัณฑ์แหนมมีความปลอดภัยจากเชื้อในตระกูล Listeria เช่น *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค ลดการใช้สารเคมีที่เติมลงไปเพื่อถนอมอาหาร ซึ่งถ้าสะสมอยู่ในร่างกายเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้น ผู้บริโภคจึงได้รับประทานแหนมที่มีคุณภาพและปลอดภัย

5.2. ข้อเสนอแนะ

5.2.1. เนื้อหมูที่เลือกมาใช้ในการผลิตแหนมควรเป็นเนื้อส่วนสะโพก เพราะมีมันติดน้อย

5.2.2. หลังจากล้างหมูแล้วควรซับเนื้อหมูให้แห้ง เพื่อไม่ให้มีน้ำในตัวอย่างแหนมมากเกินไปซึ่งจะมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมเสีย

5.2.3. การบรรจุแหนมลงในถุงพลาสติก ควรไล่อากาศออกจากถุงให้เหลือน้อยที่สุดก่อนที่จะใช้หนังยางมัดให้แน่นเพราะเชื้อแบคทีเรียแลคติก ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิตติชัย โหบาง. 2541. การแยกเชื้อและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติก. สัมมนา ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 4-7.

นภา โล่ห์ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.พิมพ์ครั้งที่1.ฟันนี่พับบลิชชิ่ง กรุงเทพมหานคร. 135-142.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2526. จุลชีววิทยาเล่ม 1 .พิมพ์ครั้งที่ 4. โอเดียนสโตร์ กรุงเทพมหานคร. 152.

พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์. 2544. การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร .พิมพ์ครั้งที่1. คุรุสภาลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร. 50.

ไพโรจน์ วิริยะจารี และคณะ. 2537. โครงการปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์แหนม. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภูริวัฒน์ ศรีปัญญาวิญญู. 2539. กรดแลคติกในอุตสาหกรรม. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูป. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. โอเดียนสโตร์ กรุงเทพมหานคร. 131-137.

สมวลี เหลืองสกุล. 2539. จุลชีววิทยาทางอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินวิโรฒประสานมิตร.พิมพ์ครั้งที่ 3. พิมพ์ชัยเจริญ กรุงเทพมหานคร. 51-151.

สิรินดา คันธจันทร์. 2544. สัมมนาการพัฒนาผลิตภัณฑ์แหนมโดยใช้เทคโนโลยีการเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นผสม. สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุรวิทย์ สิมะรักษ์อำไพ. 2545. วิทยาแบคทีเรีย. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏสุรินทร์. 259-410.

สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม. สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม. 2527. แหนม. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. มอก. 1219-2537 พี.เอ็น.เซ็นเตอร์เพรส กรุงเทพมหานคร. 8 .

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2542. ผลของน้ำกระเทียมสกัดต่อการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อและเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่พบมากในแหนมในหลอดทดลองอาหาร ปีที่ 29 (2). 109-115.

อภิญญา ผลิโกมล. แบคทีเรีย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 288 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรนุช อุตรภิชาติ. 2530. การคัดเลือกแบคทีเรียซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของซาลโมเนลลาและการผลิตกล้าเชื้อผงเพื่อใช้หมักแหนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

Brock, T.D., Smith, D.W. and Madigan, M.T. 1984. Biological of microorganism. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. 847 pp.

Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substance from lactice acid bacteria for use as food preservative. Food technology. 43: 164.

Frazier, W.C., Westhoff, D.C. 1988. Food Microbiology. 4th ed. Singapore: McGraw-Hill Co. 539 pp.

George, J. 1983. Basic Food Microbiology. USA: Saybrook Press, Inc. 781 pp.

Motlagh, A.M., Johnson, M.C., and Ray, B. 1991. Viality loss of foodoorne pathogens by Starter Culture metabolies. J. Food prot. 54: 873-878.

Rose NL, Sporns P, Stiles ME, Mcmullen LM. 1999. Inactivetion of nisin by glutathione in fresh meat . Journal of Food Science. Volume 64(5): 759-762

Sandine, W.E., 1987. Looking Backward and forward at the Practical Applications of Genatic Researches on Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbial Rev. 46: 205-220.

Swetwiwathana, A., Leutz, U., Lotong, N., Fischer, A. 2001. Potential for Use of Isolate Bacteriocin-Producing *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 from Nham (Thai Fermented Meat) to Control the Growth of Salmonella anatum. Proceeding of The 47th International Congress of Meat Science and Technology. Volume II. August 26th -31th , 2001 Krakow, Poland. P. 18-19.

Swetwiwathana, A., Leutz, U., Lotong, N., Fischer, A. 1999 a. Role of Garlic on Growth and Lactic Acid Production of Starter Cultures. International Fleischwirtschaft. 1: 26-29.

Swetwiwathana, A., Leutz, U., Lotong, N., Fischer, A. 1999 b. Controlling the Growth of *Salmonella anatum* in Nham: Effect of Meat Starter Cultures, Nitrite, Nitrite and Garlic. Fleischwirtschaft. 79(9): 124-128.

Swetwiwathana, A., Leutz, U., Lotong, N., Fischer, A. 2002. Use of Pediocin PA-1 (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) to Control *Salmonella anatum* in Nham (Thai Fermented Meat). Proceeding of the 48th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST), Rome, Italy. 25-30 August 2002.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก. 1 ตัวอย่าง แบบทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส

แบบทดสอบประสาทสัมผัสของ ผลิตภัณฑ์แหนม แบบ Hedonic scale

ชุดที่..... วันที่.....

ข้อปฏิบัติในการทดลอง

4. ชิมตัวอย่างโดยอย่าวางตัวอย่างสลับกันในการชิมตัวอย่างแต่ละชุด
5. ทดสอบคุณลักษณะของตัวอย่างเปรียบเทียบกับทั้งหมด และพิจารณาว่าคุณลักษณะของตัวอย่างที่ต้องการ เมื่อชิมแล้วให้คะแนนอย่างไร
6. การพิจารณาคะแนนและการยอมรับ แบ่งคะแนนเป็น

1 = ไม่ชอบมาก 2 = ไม่ชอบ 3 = เฉยๆ 4 = ชอบ 5 = ชอบมาก

4. ในระหว่างการชิมรสแต่ละอย่าง ใช้น้ำล้างปากเพื่อป้องกันการสับสนระหว่างตัวอย่าง
5. คุณลักษณะที่ต้องการของผลิตภัณฑ์ คือ รสชาติ

ตัวอย่าง	_____	_____
สี	.....	.....
กลิ่น	.....	.....
เนื้อสัมผัส	.....	.....
ความเปรี้ยว	.....	.....
รสชาติ	.....	.....
ความชอบรวม	.....	.....

หมายเหตุ คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์คือ รสชาติ ที่ต้องการมากที่สุด.....

ภาคผนวก ก. 2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อ NA</u>

Meat extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	12	กรัม
D.W.	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ ต้มจนกระทั่งสารละลายใส เทลงในขวดปิดฝา นำไปฆ่าเชื้อในเครื่อง auto clave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		N
FORMULA	1	30
	2	30

Descriptive Statistics

Dependent Variable: SCORE

FORMULAR	Mean	Std. Deviation	N
1	3.43	.728	30
2	3.50	.630	30
Total	3.47	.676	60

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SCORE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.000[a]	1	.000	.000	1.000
Intercept	707.267	1	707.267	1427.661	.000
FORMULA	.000	1	.000	.000	1.000
Error	28.733	58	.495		
Total	736.000	60			
Corrected Total	28.733	59			

a. R Squared = .000 (Adjusted R Squared = -.017)

Oneway

ANOVA

SCORE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	1	.000	.000	1.000
Within Groups	28.733	58	.495		
Total	28.733	59			

ภาคผนวก ข. 1 ตารางผลแสดงการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสด้านสี จากการศึกษาโดยใช้แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 กับแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		N
FORMULA	1	30
	2	30

Descriptive Statistics

Dependent Variable: SCORE

FORMULAR	Mean	Std. Deviation	N
1	3.27	.907	30
2	3.27	.828	30
Total	3.27	.861	60

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SCORE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2.132E-14[a]	1	2.132E-14	.000	1.000
Intercept	640.267	1	640.267	849.134	.000
FORMULA	.000	1	.000	.000	1.000
Error	43.733	58	.754		
Total	684.000	60			
Corrected Total	43.733	59			

a. R Squared = .000 (Adjusted R Squared = -.017)

Oneway

ANOVA

SCORE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	1	.000	.000	1.000
Within Groups	43.733	58	.754		
Total	43.733	59			

ภาคผนวก ข. 2 ตารางผลแสดงการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสด้านกลิ่น จากการศึกษาโดยใช้แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 กับแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		N
FORMULA	1	30
	2	30

Descriptive Statistics

Dependent Variable: SCORE

FORMULAR	Mean	Std. Deviation	N
1	3.27	.907	30
2	3.27	.828	30
Total	3.27	.861	60

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SCORE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.817[a]	1	.817	1.682	.200
Intercept	742.017	1	742.017	1527.940	.000
FORMULA	.817	1	.817	1.682	.200
Error	28.167	58	.486		
Total	771.000	60			
Corrected Total	28.983	59			

a. R Squared = .028 (Adjusted R Squared = .011)

Oneway

ANOVA

SCORE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.817	1	.817	1.682	.200
Within Groups	28.167	58	.486		
Total	28.983	59			

ภาคผนวก ข. 3 ตารางผลแสดงการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัส จากการศึกษาโดยใช้แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 กับแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		N
FORMULA	1	30
	2	30

Descriptive Statistics

Dependent Variable: SCORE

FORMULAR	Mean	Std. Deviation	N
1	3.83	.834	30
2	3.27	.944	30
Total	3.55	.928	60

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SCORE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4.817[a]	1	4.817	6.069	.017
Intercept	756.150	1	756.150	952.716	.000
FORMULA	4.817	1	4.817	6.069	.017
Error	46.033	58	.794		
Total	807.000	60			
Corrected Total	50.850	59			

a. R Squared = .095 (Adjusted R Squared = .079)

Oneway

ANOVA

SCORE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.817	1	4.817	6.069	.017
Within Groups	46.033	58	.794		
Total	50.850	59			

ภาคผนวก ข. 4 ตารางผลแสดงการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสด้านความเปรี้ยว จากการศึกษาโดยใช้แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 กับแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		N
FORMULA	1	30
	2	30

Descriptive Statistics

Dependent Variable: SCORE

FORMULAR	Mean	Std. Deviation	N
1	4.03	.615	30
2	3.23	.858	30
Total	3.63	.843	60

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SCORE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9.600[a]	1	9.600	17.221	.000
Intercept	792.067	1	792.067	1420.821	.000
FORMULA	9.600	1	9.600	17.221	.000
Error	32.333	58	.557		
Total	834.000	60			
Corrected Total	41.933	59			

a. R Squared = .229 (Adjusted R Squared = .216)

Oneway

ANOVA

SCORE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.600	1	9.600	17.221	.000
Within Groups	32.333	58	.557		
Total	41.933	59			

ภาคผนวก ข. 5 ตารางผลแสดงการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสด้านรสชาติ จากการศึกษาโดยใช้แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 กับแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		N
FORMULA	1	30
	2	30

Descriptive Statistics

Dependent Variable: SCORE

FORMULAR	Mean	Std. Deviation	N
1	3.97	.556	30
2	3.23	.817	30
Total	3.60	.785	60

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SCORE

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8.067[a]	1	8.067	16.513	.000
Intercept	777.600	1	777.600	1591.793	.000
FORMULA	8.067	1	8.067	16.513	.000
Error	28.333	58	.489		
Total	814.000	60			
Corrected Total	36.400	59			

a. R Squared = .222 (Adjusted R Squared = .208)

Oneway

ANOVA

SCORE

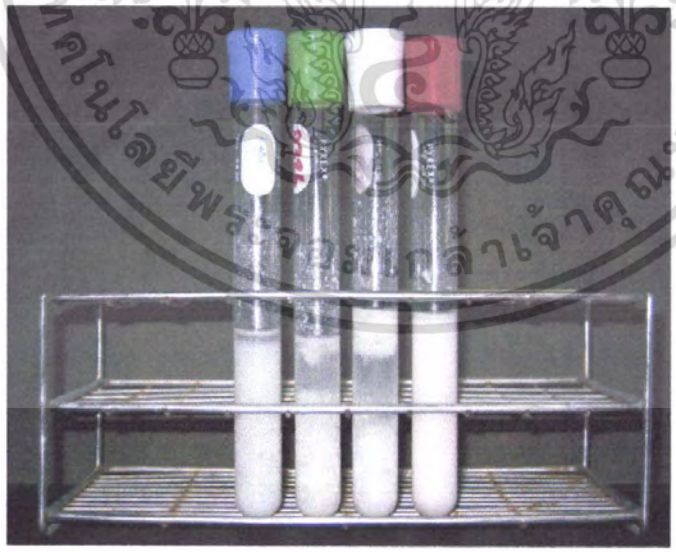
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.067	1	8.067	16.513	.000
Within Groups	28.333	58	.489		
Total	36.400	59			

ภาคผนวก ข. 6 ตารางผลแสดงการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสด้านความชอบรวม จากการศึกษาโดยใช้แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส TISTR 536 กับแหนมแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

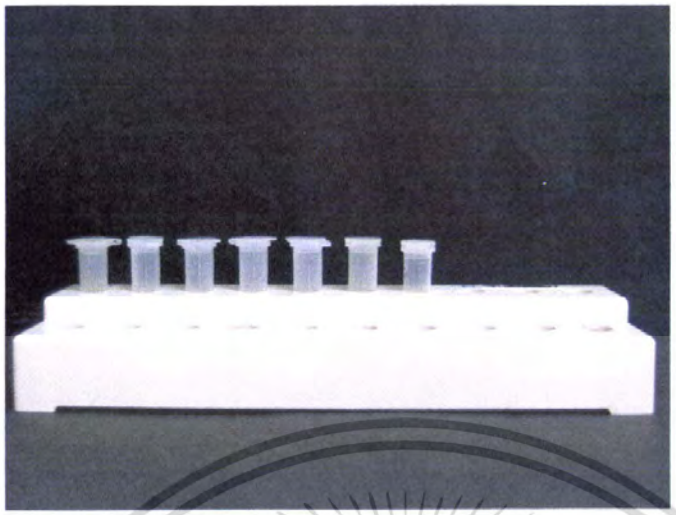
ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค. 1ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แหนมภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาคผนวก ค. 2 ตัวอย่างน้ำสกัดจากแหนม

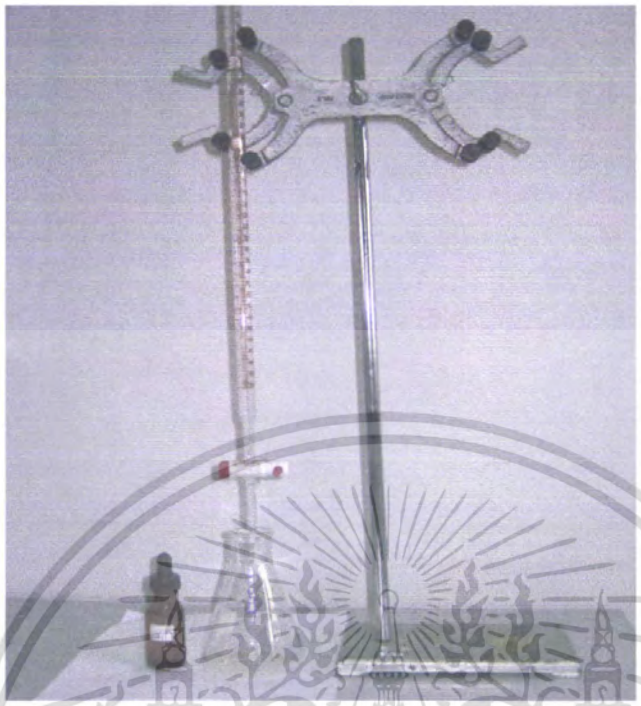
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



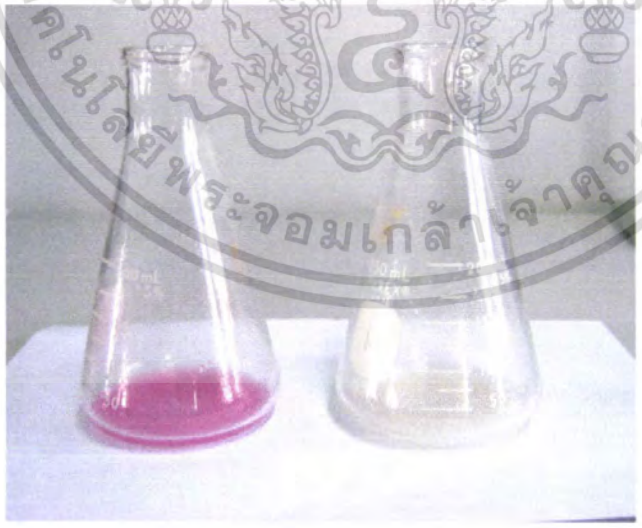
ภาคผนวก ค. 3 ตัวอย่างน้ำสกัดจากแหนมที่ถูกเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ

ภาคผนวก ค. 4 แสดง clear zone ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

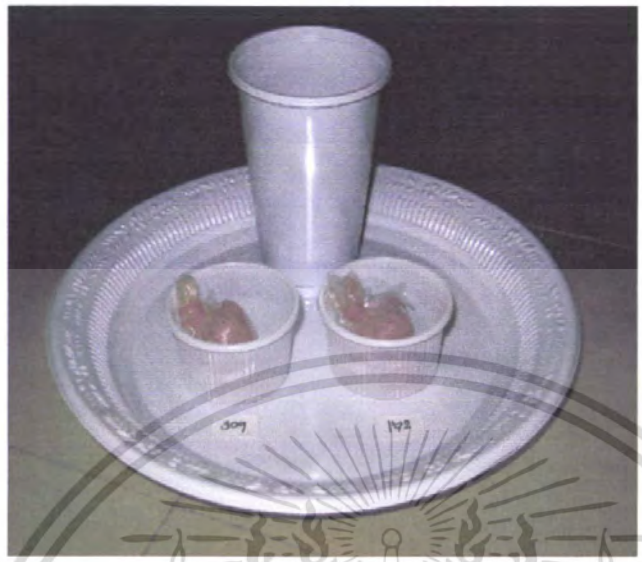


ภาคผนวก ค. 5 แสดงอุปกรณ์การไทเทรต

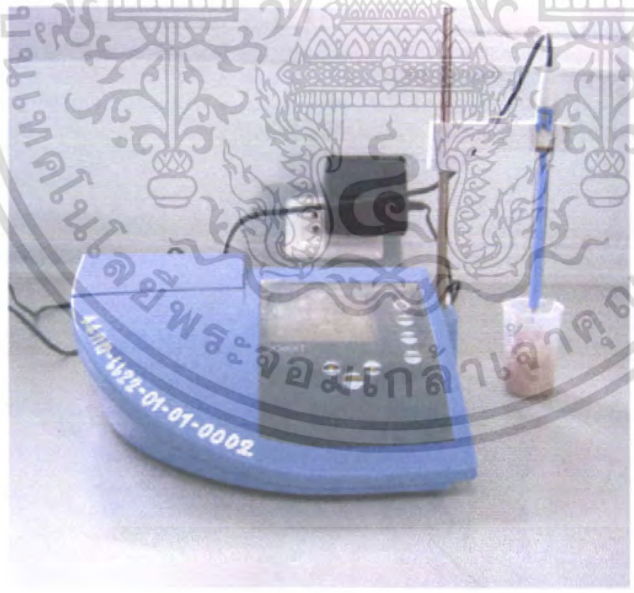


ภาคผนวก ค. 6 แสดงการเปลี่ยนสีของตัวอย่างน้ำสกัดจากแหนมหลังและก่อนการไทเทรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ค. 7 แสดงการเตรียมตัวอย่างทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส



ภาคผนวก ค. 8 แสดงการวัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH-meter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้